

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

BACTÉRIOPHAGIE ET VARIABILITÉ MICROBIENNE

par les Drs JULES BORDET et PAUL BORDET.

Le problème de la nature des bactériophages n'est pas unanimement considéré comme définitivement résolu. Peut-être les constatations récemment recueillies grâce au microscope électronique seront-elles interprétées comme favorables à la théorie du virus. Mais que l'existence du virus soit finalement prouvée ou reste contestable, il faudra en tout cas trouver l'explication de divers faits qui depuis longtemps sont considérés comme ne plaident guère en sa faveur.

Citons à ce propos quelques données.

Comme Bordet et Ciuca l'ont montré en 1921, le sérum des animaux immunisés contre un bactériophage (c'est-à-dire qui ont reçu des suspensions bactériennes lysées) neutralise définitivement celui-ci et semble donc le détruire, même s'il a été chauffé vers 60°, ce qui supprime le pouvoir bactéricide de l'alexine. S'il peut paraître singulier qu'un virus soit tué en l'absence d'énergie bactéricide, on peut néanmoins concevoir que dans ces conditions un virus, sans disparaître à proprement parler, soit mis par le sérum hors d'état de s'implanter chez la bactérie sensible, de sorte que, ne pouvant pas se multiplier, il ne peut plus manifester sa présence. Il a été bien établi d'autre part par Bordet et Ciuca que le sérum d'animaux immunisés contre la bactérie normale exempte de bactériophage ne fait aucunement disparaître celui-ci. Toutefois, da Costa Cruz [1] a signalé ce fait curieux que ce sérum empêche temporairement le bactériophage de se reproduire et permet ainsi à la multiplication bactérienne de s'effectuer pendant quelques heures, c'est-à-dire jusqu'au moment où le sérum devient inactif en raison de l'absorption des anticorps

spécifiques par les bactéries néoformées. On peut évidemment supposer que le sérum altère dans la bactérie un élément nécessaire à la reproduction du virus, mais ce n'est là qu'une hypothèse, et l'on peut aussi bien imaginer que le bactériophage est un principe chimique dans la constitution duquel entrent des matériaux élaborés par la bactérie sensible et que le sérum détrioire.

L'extrême résistance des bactériophages à la conservation ou à des antiseptiques tels que le chloroforme ne plaide pas en faveur de la théorie du virus mais ne la réfute cependant pas formellement.

Le pouvoir dont jouissent certaines espèces bactériennes, dites lysogènes, de déclencher la lyse transmissible d'autres bactéries est considéré par les partisans de la théorie du virus comme la manifestation d'un phénomène de commensalisme ou plus exactement de parasitisme discret compatible avec une croissance apparemment normale de l'espèce contaminée. Comme Lisbonne et Carrère l'ont constaté, certaines cultures du groupe colibacille déclenchent la lyse du bacille de Shiga. De plus, Bordet reconnut ensuite que si l'on sépare par la technique de l'isolement divers individus de la culture lysogène, on obtient des cultures filles parmi lesquelles il en est qui se montrent capables de lyser certaines de leurs congénères, passagèrement à vrai dire, car celles-ci s'adaptent bientôt et, fait remarquable, reproduisent désormais l'agent lytique qui les avait impressionnées et vis-à-vis duquel elles sont devenues résistantes.

Un fait difficilement conciliable avec la théorie du virus consiste en ce qu'on n'obtient pas, lorsqu'on isole et ensemence des individus microbiens présents dans une culture lysogène, des cultures filles définitivement exemptes de l'agent lytique. Cependant Bordet a obtenu de la sorte, en étudiant le colibacille lysogène de Lisbonne et Carrère, des cultures qui ne déclenchaient plus la lyse du bacille de Shiga. Mais elles récupérèrent ce pouvoir au bout d'un certain temps.

Gildemeister [2] constata qu'un bacille lysogène cultivé à basse température ne contenait plus l'agent lytique, mais que celui-ci reparaissait lorsqu'on reportait la culture à l'étuve.

L'immunsérum qui neutralise le principe actif d'un microbe lysogène n'enlève pas à celui-ci le pouvoir de le reproduire lorsqu'on le cultive ensuite en l'absence du sérum.

Nous reviendrons sur ces notions au cours du présent exposé.

CHAPITRE I

Variabilité des cultures lysogènes et production
des principes lytiques.

A. — ETUDE DU BACILLE COLIFORME LYSOGÈNE DE LISBONNE.

Nous entretenons depuis une vingtaine d'années deux souches de cette espèce microbienne, dont il a été longuement question dans des mémoires antérieurs.

En vue des expériences que nous allons relater, nous avons préféré l'une de ces deux souches, parce qu'elle présente un caractère assez particulier, dont l'intérêt se révèle lorsqu'on étudie comparativement le bacille pyocyanique, ainsi que nous le signalons plus loin. Le gazon microbien qui se développe à 37°, sur gélose ensemencée de cette souche de bacille de Lisbonne, se recouvre bientôt d'une sorte de pellicule brillante qui semble constituée d'une poussière luisante d'aspect métallique fort semblable à celle qui apparaît sur les taches de lyse dont les cultures sur gélose de certaines races de bacille pyocyanique se parsèment. Signalons à ce propos qu'au bout de quelques jours la culture sur gélose de bacille de Shiga peut offrir un aspect assez analogue ; il en est de même des cultures de gonocoque sur gélose-sérum.

En vue d'opérer sur une culture bien homogène, ensemencons sur gélose une suspension très diluée de ce bacille de Lisbonne de façon à obtenir des colonies isolées. Celles-ci sont régulièrement arrondies, assez plates, offrent l'aspect luisant métallique ci-dessus signalé. On choisit parmi ces colonies l'une des plus caractéristiques et la repique en strie sur gélose. On ensemence aussi du bouillon, dans lequel, à 37°, apparaît un trouble diffus, sans formation de flocons. Effectuons ainsi, à quelques jours d'intervalle, plusieurs repiquages en série, d'une part sur gélose, d'autre part en bouillon, et ensemencons finalement en strie deux géloses, l'une de la gélose précédente, l'autre de la dernière culture en bouillon.

Or, on constate que ces deux cultures sur gélose, ainsi obtenues, ne sont pas identiques. Celle qui a été ensemencée du microbe constamment entretenu sur gélose montre une strie homogène, revêtue de la pellicule d'aspect métallique continu et dont les bords sont nettement limités sans que la culture s'élargisse et s'étale. Celle qui a été ensemencée de la dernière culture en bouillon montre une strie dont le revêtement d'aspect métallique n'est pas aussi continu, et dont le bord se prolonge en un mince liséré qui s'étale beaucoup sans devenir luisant. On reconnaît ainsi que la culture garde mieux ses caractères pri-

mitifs sur gélose, tandis qu'en bouillon la variabilité intervient pour engendrer une race qui, lorsqu'on la transplante sur gélose, donne le liséré très mince. On reprend donc la dernière culture en bouillon et pratique l'isolement sur gélose. Les colonies séparées qu'on obtient sont de deux types très différents. Les unes, de contour régulièrement arrondi, nettement limité, sont luisantes du fait de la pellicule d'aspect métallique. Les autres, très minces, ont un bord sinueux et s'élargissent considérablement, leur surface est terne. Les premières appartiennent manifestement à la variété S (Smooth) tandis que les autres sont du type R (Rough), selon la terminologie proposée par Arkwright. En bouillon, S donne un trouble diffus, homogène ; R, des flocons qui se déposent, laissant le liquide parfaitement clair. Après avoir séjourné quatre jours à l'étuve, les cultures en bouillon S et R sont chauffées une demi-heure à 60°. De ces liquides ainsi stérilisés, on introduit respectivement III gouttes dans 2 tubes contenant 5 c. c. de bouillon, on ensemence d'une goutte de culture de bacille de Shiga, et l'on porte à 37°. Après trois ou quatre heures, les deux cultures sont nettement troubles, mais peu après, celle qui a reçu le liquide R se clarifie, tandis que l'autre s'opacifie davantage et ne s'éclaircit pas ultérieurement. La culture R contient un principe abondant. Même après 4 passages sur le bacille de Shiga, le liquide S se révèle inactif. L'apparition du principe lytique est donc corrélative de la dissociation de S en R. En répétant l'expérience, on obtient régulièrement ce même résultat. Il faut ajouter que si l'on éprouve des cultures de S en bouillon âgées de plus de quatre ou cinq jours, on peut y trouver parfois des traces de principe, ce qui se conçoit aisément, puisque, lorsque la culture de S vieillit, des individus du type R peuvent y être engendrés. Il faut naturellement, dans ces expériences qui comparent S et R au point de vue de la présence du principe, employer ces deux types tout récemment isolés.

Nous venons de signaler que R apparaît au bout de quelque temps dans le bouillon où S a été ensemencé.

Ensemencons en strie sur gélose un tel bouillon contenant désormais S et R. A ce niveau S et R poussent mélangés. Mais la culture de R, ayant la propriété de s'étendre davantage, déborde bientôt la strie et constitue autour d'elle un mince liséré très large. Si de cette culture nous repiquons sur une nouvelle gélose la matière microbienne prélevée au centre de la strie, nous obtenons une culture mixte. Mais si nous ensemencons une seconde gélose en prélevant seulement de la matière microbienne qui constitue le liséré, nous obtenons une culture R. Délayons au bout de quelques jours ces deux cultures (qu'on a eu soin d'ensemencer sur toute la surface pour qu'elles soient également riches en microbes) dans 5 c. c. de bouillon stérile et, immédiatement après, chauffons à 60° ces deux suspensions. Eprouvons-les ensuite sur le

bacille de Shiga : nous constatons que la culture provenant du liséré contient beaucoup plus de principe que celle qui a étéensemencée du centre de la strie. La supériorité de R sur S, au point de vue de la production de principe, se confirme ainsi de la façon la plus probante.

Le bouillon employé dans ces expériences a été, au cours de sa préparation, alcalinisé jusqu'à apparition d'une légère teinte rose par addition de phénolphthaleine. Après chauffage, filtration et stérilisation, il ne contient plus que peu de calcium, et ne donne par addition d'oxalate qu'un précipité discret. D'une culture du type S bien pur (récemment isolé), ensemencons un tube contenant 5 c. c. de ce bouillon, et, d'autre part, un tube pareil sauf qu'il a été additionné (à froid) de II gouttes de solution stérile de CaCl_2 à 1 p. 100. On ensemence les deux tubes d'une goutte de culture en bouillon du type S. Après une semaine à l'étuve, les deux cultures sont repiquées en strie sur gélose, puis chauffées une demi-heure à 60° et éprouvées sur le bacille de Shiga. L'aspect des cultures sur gélose montre qu'en bouillon non additionné de chlorure calcique, le type R commençait à apparaître, tandis qu'il n'existe pas encore dans le tube additionné de CaCl_2 . Or, l'épreuve sur le bacille de Shiga montre que seul le bouillon non additionné de CaCl_2 contient une trace de principe. Il semble donc qu'un excès de calcium entrave l'apparition du type R producteur de principe. En présence d'un tel résultat, il importait d'étudier de plus près le rôle des sels calciques, soit à faible dose, soit à concentration plus élevée.

L'un de nous [3] a démontré, en 1926, que le calcium est nécessaire à l'effet lytique et à la régénération du principe issu du microbe de Lisbonne et qui agit sur le bacille de Shiga. Plus récemment nous avons signalé qu'une teneur modérée de liquide nutritif en calcium est utile sinon nécessaire à l'apparition du type R dans la culture d'un colibacille du type S [4], ainsi qu'à l'influence lytique [5], sur cette espèce microbienne, d'un bactériophage longuement étudié dans nos *Mémoires* antérieurs (1). En 1930, Bordet et Renaux [6] ont fait voir que la privation de sels calciques empêche la transformation du bacille virulent du charbon en race moins virulente et moins sporogène, de sorte qu'un excellent moyen de conserver le pouvoir pathogène et la faculté sporogène de ce microbe est de le cultiver sur gélose additionnée d'oxalate de soude. Dans ces conditions, le germe garde immuablement ses qualités premières. P. Bordet [7] a montré de son côté que de nombreux microbes manifestent des caractères différents selon que leur milieu de culture contient ou non du calcium.

(1) La concentration de sel calcique exigée varie beaucoup selon qu'il s'agit de tel ou tel bactériophage.

Le bacille de Lisbonne type S bien pur est ensemencé dans trois tubes de 5 c. c. de bouillon dont l'un n'a rien reçu tandis que le second a été additionné de II gouttes de chlorure calcique à 1 p. 100, et le troisième de XII gouttes d'oxalate de soude à 2,5 p. 100. Au bout d'une semaine, ces cultures sont repiquées chacune en milieu identique ; après un nouvel intervalle d'une semaine, ces trois dernières cultures sont ensemencées en strie, d'une part sur de la gélose ordinaire, d'autre part sur gélose identique, sauf qu'elle a été refondue et réétalée après addition, par tube, de XX gouttes d'oxalate sodique à 2,5 p. 100.

Parmi les géloses non oxalatées, celle qui a été ensemencée de la culture en bouillon à laquelle on n'avait ajouté ni chlorure calcique, ni oxalate, présente un aspect particulier déjà décrit plus haut ; elle contient visiblement les deux types S et R ; la pellicule d'aspect métallique revêtant la strie n'est pas continue ; la strie est entourée d'un liséré constitué de R. Quant aux deux autres géloses non oxalatées, elles ont l'aspect de cultures de S sans mélange avec R ; la strie d'ensemencement ne s'est pas entourée d'un liséré ; elle présente sur toute sa surface l'aspect métallique caractéristique de S. Par conséquent, l'absence de calcium, comme la présence de calcium en excès, entravent la transformation de S en R, celle-ci étant favorisée par une faible concentration calcique.

Les préparations microscopiques de ces trois cultures, faites quarante-huit heures après l'ensemencement, révèlent des différences. Les cultures développées sur les géloses non oxalatées, ensemencées soit de bouillon oxalaté, soit de bouillon calcifié, sont fort semblables. Les bacilles sont en général assez courts, beaucoup d'entre eux ne se colorent que faiblement, comme s'ils subissaient un certain degré de lyse ; quelques-uns sont assez gonflés.

Quant à la culture sur gélose non oxalatée ensemencée de la culture en bouillon pur, elle se distingue nettement des précédentes en ce qu'elle renferme, outre des microbes assez courts semblables à ceux des cultures précédentes, et qui comme eux semblent avoir subi une certaine lyse, des microbes très notamment plus grands et plus gros, plus fortement colorés sans trace de lyse, souvent groupés en amas. Ces grands bacilles appartiennent au type R, ce sont eux qui constituent le liséré et produisent le principe.

Quant aux géloses oxalatées, aucune d'elles ne montre la pellicule luisante d'aspect métallique (2). On n'observe de liséré

(2) Comme il a été dit plus haut, les cultures sur milieu solide du bacille de Shiga et de gonocoque présentent un aspect analogue au bout de quelques jours ; mais on ne constate pas cet aspect s'il s'agit de gélose oxalatée.

que sur celle qui a étéensemencée de la culture en bouillon pur. Sur cette gélose, on constate, au microscope, la présence des bacilles de grande taille qui caractérisent la race R.

Les microbes qui se sont développés sur les deux autres géloses oxalatées se ressemblent, ils sont moins grands que les bacilles R observés sur la gélose précédente, mais sont néanmoins plus longs que sur les géloses correspondantes non oxalatées. Fait remarquable, sur les géloses oxalatées, on n'observe pas cette faible colorabilité qu'on remarque chez beaucoup de microbes des géloses non oxalatées et qui paraît dénoncer un certain processus lytique.

En résumé : Le type S bien pur ne fabrique pas d'embrée de principe, mais il garde la potentialité d'en produire, puisqu'il peut, à un moment donné, engendrer le type R. Dans les cultures en bouillon, l'oxalatation empêche l'apparition du type R aux dépens du type S. L'excès de calcium produit un effet analogue ; par contre, une faible teneur en calcium est favorable à la genèse du type R, comme à la production du principe. L'élimination du calcium par l'oxalate protège les microbes contre l'autolyse, laquelle, en milieu contenant du calcium, affecte surtout le type S. Le type R est constitué de microbes plus gros, plus longs et aussi plus colorables que le type S. Existe-t-il un rapport entre la vraie bactériophagie due à un principe transmissible et la faible colorabilité, indice d'un processus d'autolyse, que nous venons de signaler et qu'on n'observe pas sur milieu oxalaté ? On serait tenté de le croire, puisque le calcium est nécessaire à la bactériophagie véritable comme à cette autolyse. Mais on ne saurait, à ce propos, être nettement affirmatif. Car les cultures du bacille de Lisbonne où le microscope dénonce un certain degré d'autolyse ne montrent pas ces taches claires ou plages lytiques semblables à celles que les bactériophages font apparaître et par lesquelles ils se caractérisent. Toutefois, bien que cette preuve fasse défaut, il est possible que les deux phénomènes relèvent d'un déterminisme analogue et soient étroitement apparentés. Comme nous le verrons plus loin, l'étude de l'autolyse du pyocyanique révèle certains faits qui plaident dans ce sens.

Signalons enfin qu'au bout de quelques passages sur gélose, la race R, tout en conservant l'aspect typique de ces colonies plates et qui s'étalent sur la surface de la gélose, peut récupérer la faculté, qui semblait lui manquer au moment où l'isolement a permis de l'obtenir à l'état pur, de produire la poussière brillante argentée qui fait reluire les colonies S. Ce caractère ne distingue donc pas sûrement la race R de la race S, qui le présente au maximum. Nous insistons sur cet aspect métallique particulier, car nous le retrouverons à propos du bacille pyocyanique.

B. — ÉTUDE DU BACILLE PYOCYANIQUE.

On sait que le bacille pyocyanique manifeste une variabilité prononcée notamment pour ce qui concerne la sécrétion des pigments. Par exemple, Gessard a obtenu une race qui n'élabore que le pigment vert bleuâtre (pyocyanine), une autre qui ne produit que le pigment jaune verdâtre, une autre qui reste incolore. Ces caractères dépendent surtout de la composition du milieu nutritif. D'autre part, certaines souches du bacille pyocyanique manifestent spontanément des phénomènes de lyse dont la similitude avec la bactériophagie est frappante. Ce fait, signalé par Blanc [8], a été étudié ensuite par divers auteurs. Quiroga [9] a distingué deux races, l'une résistante qui ne produit que le pigment jaune verdâtre, l'autre lysable, qui donne le pigment vert bleuâtre. Des filtrats de la culture lysable peuvent lyser des cultures sensibles. Hauduroy et Peyre [10] relatent des faits analogues ; ils signalent que les zones de lyse prennent un aspect luisant comme si elles étaient saupoudrées d'une poussière métallique. Hadley [11] a étudié en détail la lyse du bacille pyocyanique.

En certains points du gazon microbien, se creusent des cupules de lyse, parfois assez nombreuses pour être confluentes ; à ce niveau, la couche microbienne devient beaucoup plus transparente, elle se revêt d'une pellicule d'aspect métallique analogue à celle que nous avons signalée à propos du bacille coliforme de Lisbonne. Celui-ci ne fabriquant pas de couleur, on peut en conclure que chez le bacille pyocyanique, cette poussière brillante n'a pas de rapport avec les pigments. Si l'on repique un grand nombre de fois sur gélose la couche microbienne lysée, une race résistante finit par apparaître, laquelle ne produit plus que le pigment jaune fluorescent. Il n'est pas douteux que la race capable de fabriquer le pigment vert bleuâtre est particulièrement apte à manifester la lyse.

L'un de nous [12] a constaté que si l'on repique la culture lysable en prélevant la matière d'ensemencement à l'endroit où se trouve une tache de lyse, on obtenait assez rapidement la race résistante jaune, désormais indemne. Si l'on prélève, pour les repiquages successifs d'une souche sensible, la matière microbienne à l'endroit où l'on ne voit aucune tache, le phénomène de lyse se manifeste néanmoins en certains points de la culture fille. A moins qu'on n'obtienne finalement la race résistante qui élabore seulement le pigment jaune, on ne réussit pas, par simple repiquage de la culture sensible productrice du pigment vert, à lui enlever son aptitude à donner des taches lytiques. Mais en soumettant à la technique de l'isolement une culture en bouillon assez ancienne de la race lysable et repiquant certaines colonies

séparées qui sont restées indemnes, on peut obtenir la race résistante fabriquant seulement le pigment jaune. Dans ces conditions, nous avons pu isoler aussi une race également résistante mais qui, sur gélose, reste incolore (3).

Hadley insiste sur le fait remarquable et fréquemment observé que, sur les milieux solides, une colonie isolée de la race lysable peut ne pas manifester immédiatement le phénomène lytique. Souvent, elle se développe avec luxuriance sans rien présenter d'anormal, et c'est seulement au bout d'un jour ou deux qu'une cupule de lyse se creuse à sa surface. Cette excavation peut ne pas se trouver au centre de la colonie ; elle apparaît souvent excentriquement, et même près du bord, ce qui démontre que la potentialité lytique peut rester occulte tandis que le microbe se multiplie activement. S'il s'agit d'un virus, il faut croire qu'il peut rester latent et se transmettre à de nombreuses générations successives avant de manifester son pouvoir pathogène. Si le principe est élaboré par les bactéries elles-mêmes, on doit penser qu'il apparaît seulement lorsque le substrat nutritif commence à s'épuiser, de sorte que la lyse ne s'effectue qu'à un stade déterminé de l'évolution de la culture.

Hadley a étudié comparativement le filtrat de la culture apte à la lyse et le filtrat de la culture résistante qui fabrique uniquement le pigment jaune. Il a éprouvé ces liquides sur d'autres souches de bacille pyocyanique, et particulièrement sur des souches qui ne montraient pas de lyse spontanée. Or, parmi celles-ci, il en est qui sont sensibles au filtrat de la culture lysable et qui, fait assez inattendu, sont sensibles également au filtrat de la culture résistante. Cette sensibilité se trahit par l'apparition de taches de lyse sur les cultures obtenues en étalant sur gélose la culture sensible additionnée de filtrat. En somme, il s'agit d'un pouvoir lysogène transmissible à des individus microbien de même espèce, analogue à celui que l'un de nous a signalé en 1925 en étudiant le bacille coliforme lysogène de Lisbonne. Ultérieurement d'ailleurs, ce fait de la transmissibilité du pouvoir lysogène a été observé aussi par d'autres auteurs à propos d'autres microbes.

Etant donnée la grande variabilité du bacille pyocyanique, il nous a paru que pour étudier le phénomène lytique, il convenait d'entretenir la souche lysable bien typique dans un milieu nutritif ayant toujours la même composition. Nous avons donc

(3) La composition du milieu nutritif exerce une grande influence sur la sécrétion des pigments. Ainsi, la race incolore en question ensemenée sur pomme de terre glycérinée y produit le pigment bleu mais redevient incolore dès qu'on la reporte ensuite sur gélose. La race résistante, jaune sur gélose, pousse sur pomme de terre sans fabriquer aucun pigment.

utilisé à cet effet le sérum, chauffé vers 58 à 60°, de lapin neuf, mélangé à volume égal environ de solution physiologique de NaCl. Nous avons effectué tout d'abord plusieurs passages dans ce milieu.

Lorsqu'on repique en strie sur gélose une telle culture, la traînée microbienne qui se développe en vingt-quatre heures environ à 37° est blanchâtre, saillante et assez opaque ; elle s'entoure bientôt d'un mince liséré qui se revêt de la pellicule caractéristique d'aspect métallique. Ce liséré s'élargit progressivement les jours suivants, tandis que la traînée centrale blanche qui d'abord semblait indemne présente bientôt des trous ou des cupules de lyse et se recouvre également peu à peu de la poussière brillante dont le liséré est revêtu.

L'examen de cette culture donne ainsi l'impression que la lyse ne survient qu'assez tardivement, au moment où le milieu nutritif commence à s'épuiser et à se charger de produits du métabolisme propices à l'apparition du liséré, lequel est formé de microbes particulièrement aptes, tout en se multipliant activement sur ce milieu appauvri, à subir eux-mêmes une lyse marquée et à la déclencher au sein de la masse microbienne blanchâtre précédemment développée sur la strie d'ensemencement.

Dans cet ordre d'idées, on constate que la traînée sur gélose du microbe lysable, se lyse plus promptement si l'on pratique l'ensemencement aux dépens non pas d'une culture en bouillon toute jeune, mais d'une culture déjà vieille. Une expérience plus démonstrative consiste à ensemencer en strie, d'une gouttelette de culture de la race lysable, une gélose sur la surface entière de laquelle on vient d'étaler une goutte de culture d'un race non lysable, par exemple de la variété incolore que nous avons signalée plus haut. Dans ces conditions, la traînée centrale de culture lysable se détache nettement sur le fond uniforme du gazon constitué par la variété incolore. Mais l'aspect qu'on observe est différent selon que la culture en bouillon de la race incolore qu'on a étalée sur la surface de la gélose est jeune ou âgée. Dans le premier cas, la traînée de la culture lysable est blanchâtre, opaque et ne se lyse guère ; elle ne peut s'étendre sous forme de liséré, puisqu'elle est étroitement encadrée par le gazon que forme latéralement la variété incolore. Dans le second cas, la traînée de la culture lysable ne devient pas blanche, elle manifeste très précocement une lyse intense et apparaît ainsi en clair. Il existe donc, dans la culture âgée du type incolore que l'on a étalée sur toute la gélose, des produits qui hâtent la lyse de la race sensible ensemencée en strie, de sorte que cette race n'a pas le temps de se développer sous forme d'une couche blanchâtre opaque ; la strie où elle a été déposée est transparente d'emblée, offrant ainsi un aspect fort semblable à celui du liséré

qui, sur gélose ensemencée uniquement de la race lysable, se constitue régulièrement autour de la strie, au bout d'un ou deux jours.

On doit se demander si l'entretien sur gélose de la culture lysable n'aboutit pas à une différenciation des types microbiens qui serait assez stable pour persister dans les repiquages ultérieurs. Il convient de rechercher si l'on n'obtiendrait pas de cultures quelque peu différentes en repiquant d'une part la partie centrale blanche, et d'autre part le liséré mince et transparent.

Notons tout d'abord que les cultures sur gélose dont il s'agit ici ne sont que médiocrement colorées, bien que présentant une lyse manifeste. L'aptitude à la lyse et le pouvoir de fabriquer en grande abondance le pigment vert bleuâtre ne sont donc pas nécessairement inséparables. Mais il est certain, comme nous allons le voir, que les types capables de sécréter beaucoup de pigment vert bleuâtre sont éminemment propices à manifester la lyse.

Ensemencons donc sur gélose ordinaire, en strie, une culture de la souche lysable dans le sérum de lapin. Après deux ou trois jours d'étauve et maintien pendant quelques jours encore à la température du laboratoire, repiquons au fil de platine, sur gélose, un peu de matière microbienne prélevée d'une part au centre de la strie, où s'est développée une couche blanchâtre assez opaque et en voie de lyse, et, d'autre part, au niveau du mince liséré. On observe généralement dans ces conditions, en comparant les deux cultures filles, que celle provenant du liséré se lyse un peu plus rapidement que l'autre ; elle est aussi un peu plus colorée.

En répétant l'expérience, on constate parfois que cette différence, au lieu d'être légère, est considérablement plus prononcée. Il semble en effet qu'en certains points du liséré, une variation brusque fait apparaître un type microbien fabriquant beaucoup plus abondamment le pigment vert bleuâtre, et capable aussi de se développer sur gélose en manifestant d'emblée la lyse intense qui se dénonce par une clarification très prononcée de la couche microbienne. En pareil cas, l'ensemencement en strie aux dépens de la zone de liséré où la teinte verte s'est marquée davantage ne donne pas lieu à l'apparition d'une traînée blanchâtre opaque entourée d'un liséré ; la culture qui se développe prend d'emblée l'aspect d'un liséré mince et transparent, siège d'une lyse intense, et qui se recouvre en tous ses points de la pellicule métallique, tandis que la gélose se colore intensément en vert foncé. Nous sommes ainsi en possession d'une culture manifestant au plus haut degré l'aptitude à la lyse typique. Ensemencée en bouillon ou en sérum, elle colore fortement ces liquides en vert.

Nous avons étudié le comportement de ce germe comparative-

ment en bouillon ordinaire (lequel contient un peu de calcium) et en bouillon additionné pour 5 c. c. de XII gouttes de solution d'oxalate de soude à 2,5 p. 100.

La race lysable productrice de pigment vert bleuâtre ne disparaît pas dès le premier ni même le second passage en bouillon oxalaté, mais elle s'y raréfie progressivement beaucoup au cours des passages suivants, tandis qu'elle se maintient dans le bouillon ordinaire.

Pour se rendre compte de cette différence, on repique en strie sur gélose ordinaire (laquelle est comme on sait riche en calcium) le troisième ou de préférence le quatrième passage d'une part en bouillon oxalaté, d'autre part en bouillon ordinaire. Après un jour à 37°, le contraste entre les deux cultures est très marqué.

Sur gélose ensemencée du passage en bouillon ordinaire, la traînée microbienne est lysée sur toute sa longueur et bordée du liséré habituel ; la pellicule à reflet métallique recouvre toute la culture. Sur culture ensemencée du passage en bouillon oxalaté, la traînée est épaisse, grasse, humide, sans liséré, et ne se constelle que de très rares points à reflet métallique. Si, opérant sur cette culture, on prélève un peu du gazon microbien à un endroit où il paraît indemne et applique la technique de l'isolement sur gélose, on obtient de très nombreuses colonies grasses, bombées, d'aspect parfaitement normal, et seulement de très rares colonies présentant le miroitement métallique caractéristique de la race sensible. Repiquées sur gélose, celles-ci restituent la race sensible avec sa lyse typique. Par contre, le repiquage sur gélose de l'une ou l'autre des colonies indemnes donne la race réfractaire caractérisée notamment par le fait qu'elle sécrète uniquement le pigment jaune. Au surplus, les cultures en bouillon soit normal, soit oxalaté, montrent nettement, dès le troisième ou quatrième passage, cette différence de teinte. La culture en bouillon oxalaté est jaune, la culture en bouillon ordinaire est verdâtre. Dans celle-ci, comme nous l'avons signalé plus haut, quelques individus de la race réfractaire peuvent apparaître, mais la race sensible continue à être prépondérante.

Au lieu d'oxalater du bouillon, oxalatons cette fois de la gélose en y ajoutant, par tube contenant environ 6 c. c. de gélose fondue, XX gouttes de solution d'oxalate sodique à 2,5 p. 100. Ensemencons, après un seul passage en bouillon oxalaté, la race lysable en strie sur la surface d'une telle gélose et sur une gélose non décalcifiée.

Nous obtenons deux cultures très différentes d'aspect. Sur gélose ordinaire, la traînée offre l'aspect lysé habituel, avec son centre criblé de trous, son mince liséré et son éclat métallique. Sur gélose oxalatée, le microbe ne fabrique aucun pigment. La

traînée est grise, assez saillante, humide, sans trace de lyse, sans revêtement métallique, sauf parfois en certains points très limités. L'examen au microscope montre que, sur gélose ordinaire, les bacilles sont assez longs et minces ; beaucoup d'entre eux prennent mal la couleur, trahissant ainsi un certain degré de lyse. Sur gélose oxalatée, les microbes sont plus courts et leur colorabilité est normale. L'addition d'oxalate entrave nettement la manifestation des caractères typiques de la race sensible.

Pour compléter ces résultats, ajoutons que pour établir la comparaison avec le bouillon oxalaté, on peut employer indifféremment soit le bouillon ordinaire, soit ce même bouillon additionné, par tube de 5 c. c., de 11 gouttes de solution de CaCl_2 à 1 p. 100. Ce bouillon calcifié se comporte comme le bouillon ordinaire ; l'excès de calcium qui gênait manifestement la lyogénèse dans le cas du bacille coliforme de Lisbonne ne produit pas d'effet appréciable s'il s'agit du bacille pyocyanique.

L'étude de la race résistante du bacille pyocyanique (laquelle ne produit que le pigment jaune) offre moins d'intérêt puisque cette race ne manifeste pas le phénomène lytique. Signalons toutefois que si l'on fait subir à cette variété trois ou quatre passages, d'une part en bouillon calcifié, d'autre part en bouillon oxalaté, et repique ensuite sur gélose ordinaire, l'aspect des cultures obtenues à la température de l'étuve n'est pas tout à fait identique. Reportée sur gélose ordinaire, la culture du microbe qui a passé par le bouillon oxalaté donne une traînée plus luisante, plus humide ; le microbe qui a passé en bouillon calcifié donne une couche plus sèche, d'aspect plus membraneux. Mais cette différence d'ailleurs minime est transitoire et s'atténue bientôt. Le microscope ne révèle pas de différence sensible.

(A suivre.)

ÉTUDE HISTOCHIMIQUE DES LÉSIONS DUES AUX ULTRAVIRUS LES ACIDES NUCLÉIQUES

par P. LÉPINE et V. SAUTTER (*).

L'une des caractéristiques principales des ultraviruses, qui constitue en même temps un facteur essentiel de leur identification, est la production de lésions spécifiques intracellulaires. Ces lésions, généralement qualifiées d'inclusions, siègent soit dans le noyau, soit dans le protoplasme. Tantôt les lésions ainsi produites permettent seulement de localiser l'action d'un ultravirus et de ranger les lésions observées dans un groupe général, telles par exemple les inclusions intranucléaires dites du type herpétique. Tantôt, suivant les cas, la forme de ces inclusions, leur colorabilité et leur situation sont suffisamment définies pour permettre un diagnostic non seulement du genre, mais de la variété spécifique du virus auquel on a affaire ; tel est, par exemple, le cas des corps de Negri dans la rage des rues.

Si l'importance des inclusions spécifiques est reconnue depuis longtemps, les cytologistes discutent de leur interprétation. Sans parler des hypothèses qui voyaient dans ces formations un élément figuré du virus, un stade évolutif du parasite supposé, les opinions actuelles peuvent se ramener à deux principales : ou bien la lésion spécifique est constituée par le virus lui-même (agrégat de particules ou accroissement de volume du protéide-virus jusqu'à une taille visible), ou bien les inclusions ne sont que des réactions pathologiques de la cellule traduisant une dégénérescence locale du noyau ou du cytoplasme, sous l'influence du virus, lui-même invisible.

Les méthodes histochimiques récentes nous permettront-elles de trancher ce dilemme ? Les recherches de ces dernières années ont mis l'accent sur la nature nucléoprotéique de ceux des virus qui ont pu être obtenus à l'état de pureté en quantité suffisante pour en permettre une analyse chimique. Et, dans bien des cas, ces nucléoprotéines se sont montrées proches de celles que l'on trouve normalement dans la cellule. Est-ce le cas des lésions spécifiques ?

Aujourd'hui, les recherches histochimiques de Caspersson [1]

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 7 décembre 1944.

et les très beaux travaux de J. Brachet [2, 3, 4] nous permettent de caractériser les acides nucléiques présents dans les tissus. Ceux-ci sont au nombre de deux : l'acide thymonucléique, dont le groupe hydrocarboné est constitué par le désoxyribose ($C_5H_{10}O_4$) et l'acide ribonucléique ou pentosenucléique (encore appelé acide zymonucléique en raison de son abondance dans les levures), dont le groupe hydrocarboné est le ribose ($C_6H_{10}O_5$).

L'opinion ancienne, suivant laquelle l'acide thymonucléique caractériserait le règne animal et l'acide ribonucléique le règne végétal, ne peut plus être retenue aujourd'hui. Nous savons qu'en fait les deux acides coexistent au sein des éléments cellulaires, animaux ou végétaux. Feulgen (1937) a isolé l'acide thymonucléique chez un végétal. Delaporte et Roukhelman (1938) ont pu mettre en évidence chez les levures la présence d'acide thymonucléique après élimination de l'acide ribonucléique par un traitement alcalin.

M^{me} Delaporte a longuement étudié et décrit [5] les formations attribuables à l'acide ribonucléique que l'on peut observer, en suivant une technique convenable, chez les levures et chez les bactéries. La présence de l'un et l'autre des deux acides nucléiques est donc normale dans les cellules vivantes, quelle que soit leur origine.

Plus que la caractérisation de l'un ou l'autre des acides nucléiques, c'est peut-être la comparaison entre l'état normal et l'état pathologique de la cellule qui sera susceptible de nous donner des indications intéressantes.

Ce sont, en effet, les acides nucléiques qui sont responsables de la basophilie caractéristique des formations nucléaires, et c'est dans le noyau surtout que l'on observe les inclusions spécifiques dues aux virus. La classique réaction de Feulgen permet de caractériser, par la recoloration de la fuchsine décolorée par SO_2 , le désoxyribose provenant de l'hydrolyse de l'acide thymonucléique. D'autre part, Brachet a montré, en faisant agir de la ribonucléase sur la préparation histologique, que la basophilie nucléaire disparaissait lorsque celle-ci était due à l'acide ribonucléique seul.

Nous avons donc en notre possession, par la combinaison de la réaction de Feulgen d'une part, et par la coloration au vert de méthyle-pyronine, ou par celle au bleu de toluidine après action de la ribonucléase d'autre part, le moyen de caractériser dans la cellule la présence, soit d'acide thymonucléique, soit d'acide ribonucléique.

Cette différenciation n'a pas qu'un simple intérêt documentaire. En effet, Caspersson, et après lui Brachet, ont montré que les acides nucléiques sont un facteur indispensable de la synthèse des protéines (et par conséquent probablement de la multipli-

cation des virus) ; plus spécialement les acides pentosenucléiques se trouvent constamment localisés au point de la cellule où existe une activité de synthèse des protéines : il semble bien que, dans cette synthèse, les acides nucléiques jouent un rôle de ciment entre les molécules protéiques. Il existe dans la cellule une relation entre les deux types d'acides, qui en règle la teneur. Schultze et Caspersson ont établi que la teneur en acide ribosenucléique du cytoplasme et du nucléole est fonction de la richesse en acide thymonucléique du noyau. L'étude de la division cellulaire par Caspersson et par Brachet montre que le noyau au repos présente une constitution chimique différente de celle du noyau pendant la mitose, où l'on voit que le chromosome en métaphase se distingue par sa richesse en acide thymonucléique et sa pauvreté en protéines. D'après Caspersson, l'acide thymonucléique serait responsable de la synthèse des protéines spécifiques hautement différencierées, l'acide ribonucléique synthétiseraient les protéines plus simples et plus élémentaires.

On sait d'autre part, par les travaux de Claude, qu'on trouve dans les tissus normaux des protéines lourdes dont la constitution est très proche de celle des protéines pathogènes. Il s'agit de nucléoprotéines dont l'acide est l'acide ribonucléique. C'est également l'acide ribonucléique qui entre dans la constitution des virus qu'on a pu analyser chimiquement, tel celui de la mosaïque du tabac. Enfin, on sait depuis longtemps que certains organismes inférieurs, tels que les levures et les bactéries, sont riches en acide ribonucléique.

On peut donc se demander *a priori* :

1^o Si les inclusions spécifiques dues aux virus renferment des acides nucléiques, et quelle en est la nature ;

2^o Au cas où les inclusions renferment un acide nucléique, une teneur élevée en acide thymo- ou ribonucléique peut-elle indiquer l'existence d'un métabolisme pathologique aboutissant à une synthèse de nucléoprotéines différentes des nucléoprotéines normales ?

Nous avons appliqué à l'étude histologique des virus les techniques de Brachet [6], et examiné un certain nombre de lésions spécifiques typiques par les différentes méthodes de coloration.

TECHNIQUE.

Des coupes histologiques ont été exécutées à partir d'organes présentant des lésions spécifiques typiques des affections étudiées. Les coupes étaient exécutées en série, de façon que les coupes consécutives d'un même ruban soient colorées : 1^o par la méthode spécifique de la lésion étudiée (Mann, méthode des inclusions, etc.) ; 2^o par la méthode de Feulgen pour la coloration de l'acide thymonucléique ; 3^o par le bleu de toluidine ; 4^o par le bleu de toluidine après digestion par la ribonucléase.

Les témoins de l'action de la ribonucléase étaient obtenus en plaçant au voisinage de la coupe des étalements de levure. La ribonucléase a été obtenue suivant la technique de Fischer [7] recommandée par Brachet [8].

Le matériel examiné a été le suivant :

Maladie de Nicolas et Favre : kystes à granulo-corps de Miyagawa dans le cerveau et le poumon de la souris (souche Kam., souris sacrifiées le sixième jour).

Psittacose : poumon de souris infectées par voie nasale.

Vaccine : corps de Guarnieri de la cornée du lapin inoculé par scarification (dermovaccine ou neurovaccine) et corps de Guarnieri des membranes allantoïdes de l'œuf de poule incubé inoculées avec du virus neurovaccinal.

Rage : virus fixe (souche Pasteur) cerveau de lapin, et 8 souches différentes de rage des rues africaines ou asiatiques sur cerveau de lapin.

Fièvre jaune : foie humain et foie de rhesus atteint d'affection mortelle.

Maladie de Borna, maladie d'Aujeszky, herpès : cerveau de lapin inoculé avec des souches de passage présentant des lésions typiques contrôlées par les colorations habituelles.

Pneumopathie des cobayes [9] : coupe de poumon de cobaye atteint de lésions typiques.

Ectromélie de la souris : foie de souris atteintes d'affection spontanée ou inoculées avec du virus de passage.

A titre de comparaison et de contrôle, nous avons concurremment à ce matériel examiné par les mêmes techniques des levures, des microbes divers Gram-positifs et Gram-négatifs (*B. proteus*, *B. prodigiosus*, *B. coli*, *B. anthracis*, *B. subtilis*, staphylocoque, pneumocoque), des protozoaires : cerveau de souris contenant de nombreux kystes d'*Encephalitozoon cuniculi* (affection spontanée) et enfin des rickettsies : poumon de souris infectées par voie respiratoire suivant la méthode de Durand et Giroud, renfermant de très nombreuses rickettsies.

Sur ce matériel, nous avons cherché à caractériser la présence des acides thymonucléique et ribonucléique.

I. — RECHERCHE DE L'ACIDE THYMONUCLÉIQUE.

Rappelons que la présence d'acide thymonucléique est caractérisée par la réaction de Feulgen, c'est-à-dire par la recoloration de la fuchsine après hydrolyse acide.

Les différents éléments que nous avons colorés permettent de classer nos observations en trois groupes :

1^o *Eléments contenant de l'acide thymonucléique.* — a) *Encephalitozoon cuniculi*, qui est un sporozoaire pathogène spontané de la souris.

b) Les rickettsies du typhus historique (frottis et coupes de poumon).

c) Les lésions de la maladie de Nicolas et Favre (kystes du

	ACIDE thymonucléique présent (réaction de Feulgen +)	ACIDE ribonucléique absent (bleu = 0) ou seul présent (action de la ribonucléase)	BASOPHILIE non modifiée par action de la ribonucléase
1^o Noyau des cellules :			
Chromatine.	+	0	
Nucléole	0		+
2^o Germes visibles :			
Levures.	+(1)	+(2)	+(2)
Microbes	+(1)		+
Encephalitozoon	+		+
Rickettsies	+		+
3^o Ultravirüs :			
Nicolas et Favre.	+		+
Psittacose.	+		+
Corps de Guarnieri (vaccine).	+	0 (3)	
Rage, virus fixe.	+(4)		+(4)
Rage, corps de Negri	0	0 (5)	
Fièvre jaune	0+(6)	0	+(7)
Borna, corps de J.-D	0	0	
Aujeszky	0	0	
Herpès	0	0	
Pneumopathie cobaye.	0	0	
Ectromélie souris.	0	0	

(1) La réaction est *négative* avec les méthodes courantes. Avec un mode de fixation et une technique spéciale, on arrive à mettre en évidence des organites donnant les réactions de l'acide thymonucléique.

(2) Les affinités des microbes pour le bleu de toluidine sont assez variables et sans relation directe avec le fait qu'ils sont Gram+ ou -. De même, leur sensibilité à la ribonucléase est très différente; chez les uns l'enzyme est sans action (anthracoides) alors que chez d'autres elle entraîne une digestion totale (*B. subtilis*).

(3) Les corps de Guarnieri sont discernables après coloration par le bleu de toluidine, mais ils sont faiblement colorés et contrastent avec la teinte des nucléoles.

(4) Lésions nucléolaires et débris chromatiques à l'intérieur des neurones en caryorexie.

(5) Les corps de Negri sont incolores; mais les structures internes colorées par le bleu de toluidine sont nettement visibles.

(6) Au début des lésions. Avec la méthode de Feulgen, inclusions granulaires rouge vif sur fond amorphe vert sale ou vert clair. Les lésions nucléolaires (hypertrophie, fragmentation) sont vert vif. Les inclusions constituées apparaissent en vert.

(7) Les fines granulations sont nettement colorées par le bleu de toluidine. Les inclusions plus volumineuses et les nucléoles monstrueux ne sont que partiellement colorés par le bleu, si on les compare aux coupes colorées par le Mann.

cerveau de la souris) et celles de la psittacose (poumon de souris).

d) Les corps de Guarnieri de la vaccine.

e) Dans le cas de la rage à virus fixe, les débris nucléaires situés à l'intérieur des noyaux en caryorexie, qui donnent aux lésions du virus fixe leur aspect typique, donnent des réactions indiquant la présence d'acide thymonucléique. Mais il est bien évident que, dans ce cas, l'acide thymonucléique doit être attribué aux constituants normaux, quoique altérés, du noyau et non à la présence du virus lui-même.

2^o *Eléments ne renfermant que peu d'acide thymonucléique.* — Dans ce groupe, on rencontre :

- a) Les levures.
- b) Les différents microbes visibles.

Ces deux catégories d'éléments renferment en abondance et surtout de l'acide ribonucléique, mais l'application de techniques spéciales et de méthodes fines, comme celles employées par M^{me} Delaporte (*loc. cit.*) permet de mettre en évidence, dans les levures comme dans les bactéries, la présence en quantité variable, et toujours relativement faible, d'organites donnant les réactions de l'acide thymonucléique, les méthodes courantes donnant un résultat négatif ou irrégulier.

Par contre, les mêmes méthodes ont complètement échoué avec les lésions constituant le groupe suivant.

3^o *Eléments ne contenant pas d'acide thymonucléique décelable.* — Dans ce groupe, se rangent les différents virus suivants : rage des rues, rage fixe, maladie de Borna, fièvre jaune, herpès, maladie d'Aujeszky, pneumopathie des cobayes, ectromélie infectieuse de la souris. Comme les techniques fines appliquées à la recherche des inclusions de virus demeurent négatives, il semble bien que ces dernières ne renferment pas d'acide thymonucléique du tout, ou du moins n'en renferment certainement pas autant que les quantités difficilement décelables chez les levures et les microbes.

Dans le cas de la fièvre jaune, l'examen est rendu difficile par la multiplicité habituelle des inclusions et leur fragmentation au milieu d'éléments nucléolaires eux-mêmes fragmentés. Il semble qu'il existe du reste tous les intermédiaires entre les affinités tinctoriales de la cellule normale et celles de l'inclusion constituée. Avec la méthode de Feulgen, les inclusions en voie de constitution paraissent comme des formations granulaires rouge vif sur fond vert sale ou vert clair ; les lésions nucléolaires se colorent en vert vif. Mais les inclusions typiques une fois constituées, et nous avons pu vérifier le fait par un examen minutieux de coupes en série, présentent une réaction de Feulgen négative, comme les autres inclusions intranucléaires du type herpétique.

On voit que cette classification fait apparaître une distinction très tranchée entre les lésions produites par la plupart des virus d'une part, et d'autre part celles produites par la psittacose, la maladie de Nicolas et Favre, qui se rangent nettement à côté des rickettsies et des protozoaires.

II. — RECHERCHE DE L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE.

Des coupes parallèles à celles qui ont été observées pour la recherche de l'acide thymonucléique ont été utilisées pour la

recherche de l'acide ribonucléique. Nous avons pris pour test l'action de la ribonucléase sur la colorabilité de divers éléments par le bleu de toluidine. Dans quelques cas où les réponses de la réaction au bleu de toluidine ont pu paraître douteuses, nous avons pu employer concurremment la coloration au vert de méthyle pyronine. Les résultats des deux méthodes ont toujours été concordants.

Lorsque les coupes sont traitées par le bleu de toluidine et par la ribonucléase, trois éventualités sont à considérer :

a) L'essai de coloration par le bleu avant toute action exercée par la ribonucléase montre que les éléments envisagés ne sont pas nettement colorés ; ils sont ou bien complètement incolores, ou bien très faiblement visibles, teintés en bleu vert pâle, contrastant nettement avec la coloration bleu foncé tirant sur le violet des éléments cellulaires (nucléole) ou des témoins (levures). En ce cas, l'acide ribonucléique est absent du tissu examiné.

b) L'examen préliminaire montre que l'élément envisagé prend fortement le bleu de toluidine. Par contre, après action de la ribonucléase, ces mêmes éléments ont perdu leur colorabilité ; ils sont ou très faiblement indiqués par leurs contours, ou même ont complètement disparu, emportés par la digestion. On conclut dans ce cas que l'acide ribonucléique était le seul acide présent dans l'élément examiné.

c) L'examen préliminaire par le bleu de toluidine montre que l'élément envisagé se colore fortement. Après action de la ribonucléase, la coloration est inchangée ; les mêmes éléments sont visibles sans que leur morphologie ni leur teinte aient été affectées par rapport aux groupes témoins. Il en résulte que l'élément considéré renferme autre chose de colorable par le bleu de toluidine que de l'acide ribonucléique ; il s'agit la plupart du temps d'acide thymonucléique (en ce cas, la réaction de Feulgen a été positive), mais il peut également s'agir d'une substance indéterminée qui ne soit ni de l'acide thymonucléique, ni de l'acide ribonucléique seul. On ne peut évidemment affirmer que les éléments entrant dans cette troisième catégorie ne renferment pas d'acide ribonucléique, puisqu'il se pourrait que l'acide ribonucléique, présent en petite quantité, soit masqué par la présence plus abondante d'acide thymonucléique.

Rappelons ici que si levures et microbes renferment en abondance de l'acide ribonucléique, ils ne renferment pas que lui.

Nous pouvons donc classer nos observations sous le rapport de la recherche de l'acide ribonucléique en trois groupes :

1^o L'élément renferme essentiellement de l'acide ribonucléique (coloré par le bleu de toluidine et rendu incolorable après action de la ribonucléase). Dans ce groupe, nous trouvons les levures qui ont servi de témoins aux réactions et un certain nombre de microbes comme *B. subtilis*.

2° Eléments ne renfermant pas d'acide ribonucléique (non colorables par le bleu de toluidine en dehors de toute action de la ribonucléase). Dans ce groupe, figurent essentiellement la plupart des inclusions nucléaires du type dit herpétique, c'est-à-dire celles de l'herpès, celles de la maladie d'Aujeszky. On y trouve aussi les corps de Joest et Degen de la maladie de Borna, les corps de Guarnieri de la vaccine, la pneumopathie du cobaye et les inclusions cytoplasmiques de l'ectromélie infectieuse. Les inclusions de la fièvre jaune typiquement constituées se comportent de même.

En ce qui concerne la rage des rues, les corps de Negri sont incolores quelle que soit leur taille, mais les structures internes apparaissent colorées, parfois fortement, par le bleu de toluidine à l'intérieur du corps de Negri, confirmant ainsi l'absence d'homogénéité de structure des corps de Negri.

3° Eléments colorés par le bleu de toluidine et dont la colorabilité n'est pas modifiée par l'action de la ribonucléase, c'est-à-dire devant leur colorabilité soit à l'acide thymonucléique (réaction de Feulgen positive), soit à une substance indéterminée sans qu'on puisse affirmer l'absence d'acide ribonucléique.

Ce groupe renferme un certain nombre de microbes : bacilles anthracoides, staphylocoques, proteus, etc..., pour lesquels on n'observe pas de différence dans l'action de la ribonucléase, et d'autres chez lesquels la ribonucléase, bien qu'entraînant une digestion partielle, ne fait cependant pas disparaître toute colorabilité : *B. prodigiosus*, par exemple : ce dernier renferme vraisemblablement une quantité appréciable d'acide ribonucléique.

Encephalitozoon cuniculi est très nettement coloré par le bleu de toluidine ; la ribonucléase est sans action sur lui.

Les rickettsies se présentent de même, mais alors qu'elles ont une structure assez homogène, sur *E. cuniculi*, on distingue nettement, aux forts grossissements, des zones de colorabilité différente correspondant vraisemblablement à une structure différenciée et à une condensation nucléaire.

Là encore, parmi les virus, la maladie de Nicolas et Favre et la psittacose se comportent comme les rickettsies, et à cet égard tranchent nettement sur tous les autres ultravirus. Les lésions nucléaires du virus fixe figurent encore dans cette même catégorie, mais il s'agit de débris nucléaires et nucléolaires des neurones atteints de dégénérescence oxychromatique et de pycnose ; c'est donc vraisemblablement à ces éléments nucléaires et surtout nucléolaires qu'il faut attribuer la coloration observée.

CONCLUSIONS.

Si nous résumons en un tableau unique les examens que nous avons pu faire, un contraste frappant apparaît, entre d'une part

la maladie de Nicolas et Favre et la psittacose, dont les lésions contiennent de l'acide thymonucléique et dont les éléments colorés se comportent exactement comme les rickettsies, et d'autre part, la plupart des lésions dues aux autres ultravirüs, dans lesquelles on ne trouve ni acide thymonucléique, ni acide ribonucléique.

Il en résulte :

1^o D'une part, si les formations constituées par les inclusions caractéristiques de la maladie de Nicolas et Favre et de la psittacose (granulo-corps de Miyagawa, corpuscules de Levinthal) présentent toutes les apparences d'être dues au virus lui-même, leur morphologie aussi bien que leurs affinités tinctoriales et leur compositions chimique, attestée par la présence d'acides thymonucléique, semblent en faire des organismes infravisibles figurés, vraisemblablement apparentés aux rickettsies dont ils partagent du reste certaines des propriétés biologiques, ce qui tendrait à les séparer des ultravirüs proprement dits.

2^o D'autre part, dans toute la gamme des ultravirüs proprement dits, qu'ils soient dermotropes ou neurotropes, de petite ou de relativement grosse taille, que nous avons pu examiner, seuls la rage à virus fixe et les corps de Guarnieri de la vaccine nous ont donné des réactions tinctoriales du type basophile, mais non modifiées par la ribonucléase, correspondant avec une réaction de Feulgen positive. Mais dans le cas des lésions causées par le virus rabique fixe, il s'agit manifestement de débris nucléaires résultant de la caryorexie et non pas du virus. Seuls les corps de Guarnieri paraissent nettement formés d'acide thymonucléique dans des conditions que l'on peut attribuer à la présence du virus.

Dans tous les autres cas, les virus que nous avons examinés n'ont pas présenté les réactions caractérisant l'acide thymonucléique ni l'acide ribonucléique.

Comme les méthodes employées se sont montrées assez sensibles pour mettre en évidence à la fois l'un et l'autre de ces acides dans les préparations témoins (levures, bactéries), on est naturellement conduit à conclure, soit que les virus examinés ne renferment aucun de ces acides nucléiques, soit, ce qui est plus vraisemblable, que les lésions observées sont des produits de dégénérescence cellulaire représentant des déviations du métabolisme nucléaire ou cytoplasmique sous l'influence du virus plutôt que des aspects du virus lui-même.

BIBLIOGRAPHIE

[1] CASPERSSON (T.). *Chromosoma*, 1939-1940, **1**, 427, 526 et 605 ;
Id. Naturwiss., 1941, **29**, 33.

[2] BRACHET (J.). *Enzymologia*, 1941, **10**, 87.

- [3] BRACHET (J.). *Ann. Soc. Roy. Zool. Belgique*, 1942, **73**, 93.
- [4] BRACHET (J.). *Arch. Biol. Liège*, 1941, **53**, 207.
- [5] DELAPORTE (B.). Recherches cytologiques sur les Bactéries et les Cyanophycées. *Thèse de Sciences*, Paris, 1939, et *Rev. Gén. Bot.*, 1939, **51**, 615.
- [6] BRACHET (J.). *C. R. Soc. Biol.*, 1940, **133**, 88.
- [7] FISCHER et coll. *Zeitschr. physiol. Chem.*, 1941, **271**, 246.
- [8] BRACHET (J.). Renseignements communiqués par correspondance.
Nous tenons à exprimer à M. Brachet nos vifs remerciements pour son extrême obligeance à nous faire connaître tous les détails de ses techniques.
- [9] LÉPINE (P.), SAUTTER (V.) et LAMY (R.). *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 317 ; LÉPINE (P.) et SAUTTER (V.). Ces *Annales*, 1945, **71**, 102.

SUR LES STREPTOCOQUES DES MAMMITES BOVINES

par L. COTONI, P. FORGEOT et G. THIEULIN.

Au cours de recherches bactériologiques anciennes sur les streptocoques, nous avions été amenés à étudier les caractères des streptocoques de la mammite contagieuse des vaches laitières. La lecture des travaux étrangers nous faisait souhaiter d'étudier également l'épidémiologie et la prophylaxie de cette affection, d'une importance économique si grande. L'un de nous, en collaboration avec Beaufrère et Gély, s'est attaché à cette étude, dans le domaine de l'inspection sanitaire, et les résultats en ont été publiés ailleurs. Des difficultés pratiques causées par la guerre ayant ralenti nos recherches, nous rapportons dès maintenant les résultats purement bactériologiques, tirés de l'étude d'un certain nombre d'échantillons de streptocoques.

Dans notre pays, où Nocard et Mollereau ont mis en lumière l'agent pathogène causant de nombreuses mammites (1884), très rares sont les études consacrées à cette affection. Au contraire, à l'étranger, on rencontre des travaux nombreux et étendus. Rappelons entre autres noms, ceux de Minett, Stableforth et Edwards, qui ont fait sur les mammites des recherches cliniques, bactériologiques et épidémiologiques particulièrement importantes ; en Allemagne, Klimmer et Haupt, Sielemann ; au Canada, Rosell ; en Autriche, Diernhofer (1936) ; en Suisse, Steck, Zollikofer, etc.

ISOLEMENT DES ÉCHANTILLONS DE STREPTOCOQUE.

Ces échantillons proviennent de l'ensemencement de laits obtenus par traite séparée des différents quartiers de la mamelle chez des vaches suspectes ou atteintes de mammite. Les lésions étaient, suivant les cas, peu avancées et d'un diagnostic clinique douteux, ou anciennes, datant parfois de plusieurs années et d'un diagnostic indiscutable.

L'aspect du lait varie suivant les cas. Tantôt c'est l'aspect du lait normal, tantôt l'examen à l'œil nu montre la présence de caillots très fins ou volumineux. La coloration varie entre blanc, jaune sale, rosé (présence de sang), et même vert, quand la transformation purulente est accentuée. Le lait montre, après repos, une couche *supérieure* de crème et une couche *inférieure* de cou-

leur variable contenant parfois des flocons de pus de taille également variable. La réaction du lait est acide ou alcaline. L'examen microscopique a porté, à l'arrivée au laboratoire, sur le lait total, la crème et le culot de centrifugation. On peut n'apercevoir alors à l'examen microscopique aucune forme microbienne, lors même que l'ensemencement révèle la présence de streptocoques ; dans d'autres cas, on trouve, de préférence dans le culot de centrifugation, de nombreux polynucléaires plus ou moins altérés, des chaînettes en nombre très variable de cocci Gram-positifs, chaînettes plus ou moins longues, parfois extrêmement longues, occupant même plusieurs champs microscopiques. Des germes Gram-positifs, bacilles ou cocci, disposés en diplocoques, peuvent accompagner ou non les chaînettes. La présence de chaînettes longues et flexueuses dont certains fragments sont inclus dans des phagocytes (Kissig et Angermann) suffit souvent en pratique à affirmer le diagnostic de mammite à streptocoques.

Les ensemencements ont été pratiqués avec le lait entier, la crème, le culot de centrifugation et, en cas de lait purulent, après dilution préalable en bouillon. On a utilisé les milieux suivants : gélose Martin inclinée, simple ou glucosée à 2 p. 1.000 (pH = 8), additionnée ou non de sérum équin ou de lait normal, ou de sang de mouton. Les ensemencements ont été faits généralement à la surface des milieux. L'emploi de la gélose-sérum nous a montré souvent des résultats meilleurs. Plusieurs fois nous n'avons observé aucun développement microbien, à 37°, après ensemencement de laits, où l'examen microscopique direct montrait la présence de streptocoques (1). Aussi peut-on penser que la détection des streptocoques de la mammite serait très incertaine dans des échantillons de lait ne les contenant qu'à l'état de rares unités microbiennes. Les ensemencements *anaérobies* ne nous ont pas paru en général préférables aux aérobies. En dehors des colonies streptococciques, les tubes ensemencés montrent souvent des colonies étrangères (*B. coli*, dont la végétation abondante rend difficile ou impossible l'isolement ; staphylocoques blanches ou dorées, bacilles Gram-positifs divers, etc.).

Il y a un intérêt capital à ensemencer le plus tôt possible après la traite et n'utiliser que le lait recueilli après rejet de la première portion ; cette pratique réalise un lavage préalable des canaux galactophores et les débarrasse des germes saprophytes. Le transport dans la glace du lait au laboratoire est à souhaiter. Des échantillons de lait, conservés à + 5° plusieurs jours peuvent en-

(1) Les difficultés rencontrées pour isoler le Streptocoque pathogène dans des laits provenant de cas authentiques de mammite nous ont incités à rechercher dans certains laits la présence éventuelle de bactériophages (LIPSKA et d'autres auteurs) ; nos recherches ont été négatives.

core fournir des colonies streptococciques, si ces dernières ne sont pas masquées par le développement du *B. coli*.

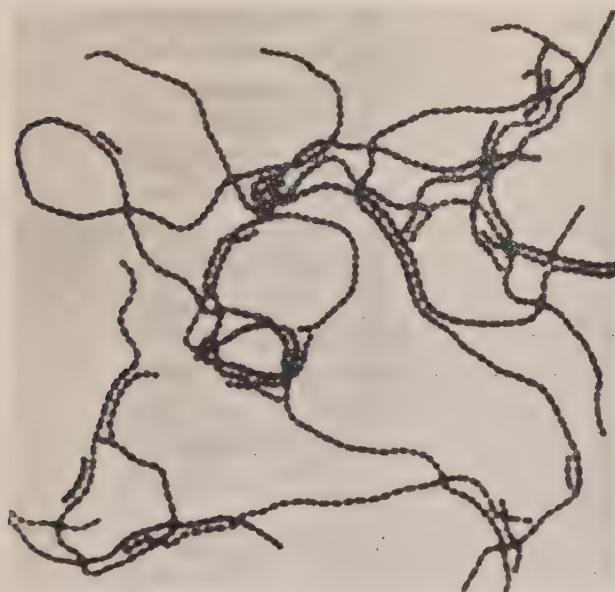
Le problème de l'isolement des streptocoques de la mammite dans le lait a fait l'objet de recherches nombreuses. De multiples techniques ont été successivement proposées : c'est la preuve de la difficulté du problème. Plusieurs sont compliquées et, pour certains auteurs, ne paraissent pas donner des résultats meilleurs que les techniques plus simples. Ainsi Klimmer, Haupt et Roots (1928) sément le lait sur la gélose à l'extrait de viande, additionnée de peptone, sérum équin et saccharose. L'attaque de ce sucre par les streptocoques de la mammite entraîne le virage au jaune du rouge de bromocrésol, au niveau des colonies en question. Minett, Stableforth et Edwards préconisent l'emploi de la gélose-sang, à laquelle Edwards ajoute du crystal violet pour gêner le développement d'autres espèces bactériennes. Kissig et Angermann (1937) préfèrent la gélose ordinaire. Steck (1939) ensemence, dans la profondeur, de la gélose glucosée additionnée de sérum et identifie les streptocoques de la mammite par leur action sur raffinose, mannite, inuline et saccharose. Zollikofer (1941), comparant cette méthode aux méthodes classiques, estime que l'emploi de la méthode de Steck, en liaison avec ces dernières, offre des avantages incontestables. Roots (1944) dont les recherches ont porté sur 8.000 échantillons de streptocoques, préconise l'emploi d'une gélose-sang voisine de celle de Brown, mais additionnée de sang de *bœuf*. Les ensemencements sont pratiqués dans la profondeur du milieu. La plupart des espèces bactériennes du lait ne se montrent pas hémolytiques, au moins dans les vingt-quatre premières heures de culture. Le streptocoque de la mammite, lorsqu'il n'est pas hémolytique, est impossible à reconnaître dans ce milieu, mais dans 93 à 96 p. 100 des cas, ses colonies hémolytiques offriraient un aspect voisin de l'aspect alpha-1 de Brown. Roots estime que ce milieu est préférable à la gélose saccharosée, où l'on ne décèle le streptocoque de la mammite que dans 80 p. 100 des cas, et à la gélose ordinaire (55 p. 100 des cas). Diernhofer (1932) note avec raison que l'hémolyse n'est pas un bon critérium pour reconnaître les streptocoques de la mammite, puisqu'on sépare ainsi des échantillons de streptocoques voisins biologiquement et pathogéniquement, tandis qu'on confond d'autre part des échantillons franchement hétérogènes.

RÉSULTATS OBTENUS.

58 échantillons de streptocoques ont été isolés, que nous avons, sans difficultés le plus souvent, conservés à la glacière pendant plusieurs mois, en ampoules de bouillon additionné d'1/10 de sérum équin.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES.

Sur ces 58 échantillons, nous en comptons 38 typiques, qui offrent les caractères classiques des streptocoques de la mammite, 10 atypiques plus ou moins voisins des précédents, 2 échantillons d'entérocoques, et 8 échantillons de streptocoques difficiles à classer. L'examen du tableau I fixera les idées.

1^o STREPTOCOQUES DE LA MAMMITE (tableau I). — Décrits par

Streptocoque de la mammite bovine. Culture en eau peptonée glucosée.
Coloration Gram-fuchsine. Gross. : 2.000 X. (Photo. Jeantet.)

Nocard et Mollcreau sous le nom de streptocoques de la mammite contagieuse des vaches laitières, par Kitt (*Str. agalactiae*), par Guillebeau (*Str. mastitidis contagiosae*). Leurs cultures en eau peptonée glucosée à 2 p. 1.000 (milieu T) et en bouillon Martin-sérum équin offrent un aspect trouble et présentent un dépôt abondant de consistance très muqueuse, que l'agitation du tube émulsionne dans le liquide, devenu ainsi plus trouble encore ; à l'examen microscopique, chaînettes extrêmement longues, occupant parfois plusieurs champs du microscope, mêlées les unes aux autres de

ECHANTILLONS MICROBIENS	MORPHOLOGIE (milieux liquides)	PRODUCTION d'hémolysine	ATTAC de l'hippus de sod
Pa 6 Ag.	Bouillon-sérum : dépôt en vrille disparaissant par agitation. Chainettes moyennes, peu flexueuses, cocci petits.		+
Pa 6 PD	Chainettes moyennes de diplocoques allongés; gros diplocoques isolés.		++
Pa 18 PG	Chainettes moyennes, peu flexueuses; cocci petits.		++
Pa 18 PD	Chainettes moyennes, cocci ovales.		+
7 PG.	Chainettes longues et flexueuses, quelquefois mêlées. Coccis volumineux; taille inégale des cocci dans la même chaînette.	Bouillon-sérum : non hémolytique. Gélose sang : x.	++
7 PD.	Chainettes moyennes, cocci arrondis, petits.		++
15 PD.	Dépôt en vrille disparaissant par agitation. Chainettes courtes de diplocoques ovales; diplocoques isolés.		++
15 AG	Dépôt en vrille disparaissant par agitation. Chainettes longues, cocci volumineux.		+
Lait 7 PG.	Chainettes courtes et moyennes, cocci ronds, petits.		++
Lait S 19	Chainettes courtes, cocci petits.		+++
8 a.	Eau peptonée : trouble, dépôt en vrille après agitation. Chainettes quelquefois longues; gros diplocoques.	Bouillon-sérum : non hémolytique.	+
14 a	Eau peptonée : trouble, dépôt en vrille après agitation. Chainettes courtes.	Bouillon-sérum : non hémolytique. Gélose sang : o.	+
4 b	Eau peptonée : Chainettes de cocci volumineux.		+
11 a.	Eau peptonée : trouble, dépôt en vrille après agitation. Chainettes moyennes.		+
Pompadour.	Eau peptonée : liquide presque limpide, dépôt en vrille après agitation.		+
P 29	Même aspect macroscopique. Chainettes très longues.		+++

ÉCHANTILLONS MICROBIENS	MORPHOLOGIE (milieux liquides)	PRODUCTION d'hémolysine	ATTAC
			de l'hippu de soda
P 24	Eau peptonée : trouble, dépôt peu abondant, chainettes courtes.		Faib.
P 6	Eau peptonée : liquide clair, dépôt en mie de pain, chainettes flexueuses.		+
P 28	Même aspect.		++
Lait VI-29.	Liquide presque limpide, dépôt en vrille après agitation. Chainettes courtes et moyennes.		Faib.
Lait VIII-29.	Eau peptonée : même aspect macroscopique, chainettes très longues.		++
Lait XII-29	Trouble. Dépôt grumeleux, incomplètement émulsionnable par agitation. Chainettes courtes, petits amas.		++
Culot lait 7 PG	Eau peptonée : liquide presque limpide, dépôt muqueux, émulsionnable. Chainettes moyennes ou longues.		+
Lait L 6 PD.	Même aspect, chainettes moyennes.		+
Lorel 4.	Chainettes courtes, diplocques.		++
Le Floch 9 PG	Eau peptonée : dépôt muqueux, chainettes longues.		+
Le Floch 7 AD	Même aspect.		+
Duval 13 AD	Eau peptonée : dépôt muqueux, chainettes très longues, mêlées.		+
Duval 13 PG	Eau peptonée : chainettes de longueur exceptionnelle, inextricables.		++
Culot 16 PD. Colonie opaque.	Eau peptonée : liquide clair, dépôt très muqueux. Chainettes longues de coccioles.		+
Culot 16 PD. Colonie grise.	Même aspect, chainettes moyennes.		+
J 9 AG	Bouillon-sérum : dépôt grumeleux, difficile à émulsionner.		+
Lait 8 anaérobie	Eau peptonée : gros dépôt muqueux, chainettes interminables.		+
PA 6 AD anaérobie.	Même aspect.		+
7 PG anaérobie	Même aspect.		+

ÉCHANTILLONS MICROBIENS	MORPHOLOGIE (milieux liquides)	PRODUCTION d'hémolysine	ATTAC de l'hippu de sodia
Oka PD.	Eau peptonée : liquide clair, fins grumeaux suspendus, dépôt muqueux incomplètement émulsionnable ; chainettes moyennes et longues.		+
Sagaïe Pg 3.	Eau peptonée : liquide clair, grumeaux suspendus, chainettes moyennes, amas de cocci.		+
Sagaïe PG 5	Même aspect.		+

façon inextricable, composées de cocci ovales plus ou moins allongés, groupés eux-mêmes régulièrement en diplocoques (figure 1).

Tel est l'aspect classique. En fait, on peut rencontrer des aspects différents, les caractères bio-chimiques ultérieurement étudiés imposant néanmoins le diagnostic de streptocoque de la mammite. Ainsi, dans le milieu T, les germes peuvent pousser agglutinés au fond du tube, qui contient au-dessous du liquide clair, un dépôt muqueux s'émulsionnant par agitation ; ou bien, sous le liquide limpide, on voit un dépôt ayant l'aspect de mie de pain et que l'agitation émulsionne imparfaitement. *L'aspect microscopique* ne répond pas toujours non plus invariablement à la description classique. La disposition des cocci en chaînettes est un fait constant, mais la taille de ces dernières se montre très variable, depuis la chaînette très courte jusqu'aux chaînettes interminables. La forme des éléments, ronde, ovale, lancéolée, parfois presque bacillaire, varie aussi suivant l'échantillon de streptocoque, leur groupement par 2, en chaînettes ou en amas, la taille, qui peut différer même entre les différents grains d'une chaînette. En un mot, l'aspect à l'œil nu ou au microscope dans les milieux de culture n'est pas toujours assez caractéristique pour imposer le diagnostic, et nécessite la recherche des caractères bio-chimiques en vue d'une identification précise.

Les *milieux de culture* utilisés dans ces recherches ont été déjà décrits dans un mémoire antérieur (Cotoni et Floch) auquel nous renvoyons. Parmi ces milieux, certains servent à différencier les streptocoques de la mammite, des autres grands groupes de strep-

ATTAQUE DE							
Mannite	-	-	-	-	-	-	-
Saccharose	+	+	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-
Salicine	-	-	-	-	-	-	-
Esculine	-	-	-	-	-	-	-
COAGULATION DU LAIT							
				+			
CROISSANCE EN LAIT additionnée de bleu de méthylène (0,1 p. 100)							
				-	-	-	-
CROISSANCE EN MILIEUX fortement chlorurés (6,5 p. 100 de NaCl)							
				-	-	-	-
CROISSANCE A							
				10°	20°	45°	
SURVIE après chauffage 30 minutes à 60°							
PRODUCTION DE H ₂ O en bouillon-sérum équin							
POUVOIR PATHOGÈNE (Souris)							

tocoques (*viridans*, lactiques, entérocoques), d'autres milieux sont employés pour distinguer les streptocoques de la mammite dans l'intérieur même du groupe des streptocoques pyogènes.

L'attaque de l'*hippurate de sodium* est constante, plus ou moins énergique suivant l'échantillon étudié, mais n'est pas l'apanage du streptocoque de la mammite ; dans le cas où l'on éprouverait de la difficulté à classer un échantillon de streptocoque, ce signe seul ne suffirait pas à lever toute hésitation. Un germe qui n'attaque pas l'*hippurate* manque souvent de plusieurs autres caractères des streptocoques de mammite typiques. L'attaque de l'*hippurate* se rencontre dans le groupe des streptocoques pyogènes exclusivement chez les streptocoques du groupe B de Lancefield et particulièrement chez les streptocoques de la mammite classiques.

L'attaque de l'*esculine* fait presque constamment défaut. Sa constatation, jointe à celle de plusieurs autres signes anormaux (résistance au chauffage trente minutes à 60°, développement en lait bleu, en milieux hyperchloruré ou hyperalcalin) impose le diagnostic d'*entérocoque*.

L'attaque de la *mannite* est également négative. Quand elle existe chez un échantillon de streptocoque du lait, on trouve en même temps un ou plusieurs autres caractères différant de ceux du streptocoque classique de la mammite.

L'attaque du *saccharose* est toujours positive, celle de la *salicine* et du *raffinose* inconstante.

Le développement dans le *lait*, suivi de coagulation est rapide

et constant, la réaction devenant acide, mais ce caractère n'est nullement particulier au streptocoque de la mammite.

Les caractères suivants font presque constamment défaut aux streptocoques de la mammite : développement à 37° en *lait bleu* de Sherman (lait additionné, à 0,1 p. 100 de bleu de méthylène), en *milieu salé* à 6,5 p. 100, *développement à 45°, résistance au chauffage* trente minutes à 60°, production *d'eau oxygénée*. Quand, chez un échantillon de streptocoque trouvé dans le lait, on rencontre un de ces caractères, il est associé à un second ou à d'autres encore, et le diagnostic de streptocoque de la mammite est alors à rejeter.

Restent trois caractères que nous avons étudiés sur un plus petit nombre d'échantillons, et qui semblent posséder une valeur diagnostique moins importante.

Le pouvoir hémolytique passe en général pour faible ou nul chez les streptocoques de la mammite. Deux techniques ont été utilisées pour sa mise en lumière.

1° *Milieu liquide*. — 25 échantillons cultivés à 37° pendant dix-huit heures en bouillon additionné de 1/10 de sérum équin n'ont montré aucun pouvoir hémolytique en présence d'hématies de mouton et de cheval.

2° *Milieu solide*. — Depuis longtemps Brown (1919) a trouvé que la production d'hémolyse par les streptocoques cultivés en gélose-sang est liée à l'observation d'une technique précise, l'inobservation de certains points de la technique pouvant entraîner des résultats divergents. Brown décrit divers aspects de l'hémolyse ou de la non-hémolyse sous les noms alpha, bêta, gamma. 4 échantillons typiques de streptocoque de la mammite nous ont fourni des colonies de type gamma, dépourvues de tout anneau hémolytique ; 2 autres échantillons ont fourni des colonies très faiblement hémolytiques, à bords nettement limités, entourées d'une aire étroite verdâtre d'hémolyse partielle, ou bien verdâtres elles-mêmes sans aire, ou encore des colonies entourées d'une zone interne incolore et d'une zone externe, verdâtre. Ces différents aspects sont plus ou moins voisins de l'aspect alpha de Brown, mais ils diffèrent tous de l'aspect bêta d'hémolyse franche.

Le pouvoir pathogène expérimental manquait chez les 2 échantillons examinés, incapables de tuer la souris (voies sous-cutanée, intrapéritonéale, intra-cérébrale) à la dose de 1/10 de centimètre cube, ou le cobaye (voie sous-cutanée), à la dose de 1 c. c.

La faculté de pousser à des températures inférieures à 37° est variable suivant les échantillons. Ensemencés en milieu T, les streptocoques de la mammite étudiés par nous, ne se développent pas à 10° ; 20 échantillons ont pu pousser à 20°.

Ensemencé dans le filtrat de sa culture de vingt-quatre heures.

un de nos échantillons typiques a poussé maigrement à 37°, un repiquage ultérieur dans le filtrat en question est demeuré négatif.

2° STREPTOCOQUES TRÈS VOISINS DES PRÉCÉDENTS (tableau II). — A côté des 38 échantillons de streptocoque de la mammite typique, se placent 10 autres échantillons très voisins. 5 ne diffèrent des premiers que par un seul caractère ; ainsi 8 de lait pousse dans le lait bleu de Sherman où il réduit légèrement le bleu de méthylène ; OKa G. C. n'attaque pas l'hippurate, 3 autres échantillons (12 de lait, P 27 et P 7 AD (1 colonie) se développent dans le bouillon hypersalé. 5 autres échantillons diffèrent des streptocoques classiques de la mammite par 2 caractères : par exemple, P₁₀ AD, 4 β et 10 γ attaquent esculine et mannite, lait V attaque esculine et se développe à 10° ; P 20 pousse en milieu hypersalé et résiste au chauffage 30 minutes à 60°.

3° STREPTOCOQUES PLUS ÉLOIGNÉS (tableau II). — Sur les 10 échantillons, 2 (P 21 et Magode AD Fg) sont des entérocoques typiques, 5 (4 a, lait 11, lait 1, Magode Ag et Jaquet n° 4), des entérocoques atypiques. Quant aux 3 derniers échantillons étudiés (lait 19 anaérobiose, OKa p. c. et OKa Fg) nous sommes incapables de les ranger parmi les entérocoques (absence de développement dans les milieux « hostiles » cités), ou parmi les streptocoques classiques de la mammite.

D'une façon générale, on remarquera à la lecture du Tableau II *l'extrême variété des caractères* chez les échantillons qui diffèrent des streptocoques classiques de la mammite. Plus on accroît le nombre des milieux d'épreuve, plus on accroît aussi le nombre des échantillons aberrants. Si l'on examine le tableau n° III réunissant une partie des caractères assignés par Seelemann aux *Str. agalactiae*, *dysagalactiae* et *uberis*, seuls pourraient être étiquetés *Str. dysagalactiae*, 2 de nos échantillons (OKa G. C. et OKa fg.) et seul pourrait d'autre part être appelé *Str. uberis*, notre Pa 10 AD. Nous rappellerons seulement que Diernhofer désigne par ce terme certains agents de mammites bénignes ; en Grande-Bretagne, Minett, Stableforth et Edwards les décrivent sous le nom de « Streptocoques de la mammite du groupe III ». Plastridge et ses collaborateurs, puis Little les ont aussi étudiés. Il faut reconnaître que la description précise des caractères biochimiques de ces trois types de streptocoques offre certaines différences suivant les auteurs (Nottbohm, Slanetz et Nagshki, Seelemann).

CARACTÈRES SÉROLOGIQUES.

Etant donné la variété des caractères morphologiques et biochimiques des streptocoques de la mammite, l'étude sérologique de

ÉCHANTILLONS microbiens	MORPHOLOGIE (milieux liquides)	PRODUCTION d'hémolysine	ATTAC l'hippophore de souris
8 de lait	Bouillon-sérum : trouble, dépôt faible. Chainettes courtes, petits cocci groupés en amas et diplocoques.		+
OKa G.C.Fg	Eau peptonée : liquide clair, grumeaux, dépôt. Chainettes courtes et moyennes, cocci groupés en gros amas.		-
12 de lait	Eau peptonée : liquide clair, dépôt en mie de pain. Nombreuses chainettes, très longues, très flexueuses.		+
P 27	Bouillon-sérum : liquide clair, dépôt muqueux, chainettes courtes et moyennes (aspect typique).		+
Pa 10 AD	Eau peptonée : dépôt grumeleux, chainettes courtes à cocci ovales.		+
4 β	Bouillon-sérum : chainettes courtes.		++
10 γ	Trouble accentué. Chainettes courtes, cocci isolés et diplocoques.		+
Lait V	Liquide presque clair. Dépôt grumeleux, cocci isolés et chainettes moyennes; cocci gros, ovales.		++
P 20	Eau peptonée : trouble peu accentué, dépôt faible. Chainettes courtes.		+
P 21	Eau peptonée : trouble peu accentué, dépôt faible. Chainettes courtes.		+
Magode AD Fg . .	Eau peptonée : trouble accentué, dépôt minime. Diplocoques ovales, isolés et en petits amas.		+
4 α	Bouillon-sérum : trouble accentué. Pas de chainettes, diplocoques et cocci isolés, ronds.		+
Lait 11 anaérobie .	Eau peptonée : trouble, dépôt disparaissant par agitation. Chainettes courtes et diplocoques.		+
Lait I	Trouble très accentué. Dépôt grumeleux, disparaissant par agitation. Coccis volumineux, ovales, disposés en diplocoques et petits amas.		+
Magode Ag	Eau peptonée : trouble très accentué. Dépôt de gros amas s'émulsionnant imparfaitement après agitation. Chainettes courtes et rares. Diplocoques lancéolés.		-
Jaquet n° 4	Eau peptonée : trouble, ondes, dépôt s'élèvant en vrille après agitation. Coccis volumineux, ovales, en diplocoques et petits amas.		-
Lait 19 anaérobie .	Eau peptonée : trouble accentué, dépôt muqueux s'émulsionnant par agitation.		-
OKa pc	Eau peptonée : trouble, dépôt s'émulsionnant par agitation. Chainettes très courtes.		-
OKa Fg	Eau peptonée : liquide clair, grumeaux, dépôt abondant, muqueux. Chainettes moyennes et longues, flexueuses.		-
		type γ	-

	MORPHOLOGIE EN BOUILLON	MORPHOLOGIE sur agar	ATTAC de l'hippu de sodia
Str. agalactiae . . .	Aspect typique : limpide, avec dépôt muqueux ; chainettes longues. Aspect atypique : trouble, avec dépôt faible ; chainettes courtes et moyennes.	Colonies grises, transparentes.	+
Str. dysagalactiae . .	Aspect trouble, avec dépôt quelquefois grumeleux. Diplocoques, chainettes courtes et moyennes.	Colonies grises, transparentes.	-
Str. uberis	Aspect légèrement trouble, flocons, dépôt, chainettes et diplocoques.	Colonies claires, à bords unis.	+

ces germes offrait un intérêt particulier. Entreprise aux Etats-Unis (Lancefield), plus tard en Australie (Stewart), elle a fait l'objet de recherches très étendues en Grande-Bretagne. Stableforth a mis en lumière l'existence de types sérologiques divers par 3 techniques : agglutination sur lames, absorption des agglutinines et précipitation d'extraits microbiens acides, au moyen de sérum expérimentaux. Stableforth distingue 3 types et 5 sous-types. L'emploi des méthodes sérologiques remplace ainsi la recherche des nombreux caractères biochimiques pour l'identification des streptocoques du lait. Diernhofer en Autriche a isolé, sur 1.057 échantillons de streptocoques de la mammite, 1.021 *Str. agalactiae*, 8 *Str. dysagalactiae*, et 5 *Str. uberis*, qu'il assimile respectivement aux groupes I, II et III anciennement décrits par Minett, Stableforth et Edwards. En France, Lesbouyries et Adam, en 1933, ont proposé d'établir le diagnostic de la mammite streptococcique par la séro-agglutination, pratiquée avec le sérum des vaches infectées, mais aucun travail systématique n'a été entrepris sur les caractères sérologiques des streptocoques de la mammite. Nous n'avons personnellement qu'ébauché cette étude.

2 échantillons typiques, 7 Pg et 14 A, nous ont servi à préparer chez le lapin, des sérum agglutinants.

Chaque échantillon est cultivé en milieu liquide (digestion peptique de viande de bœuf, glucosée à 2 p. 1.000). Les cultures, âgées de dix-huit heures à 37°, sont centrifugées. Le culot est émulsionné dans un volume équivalent d'eau salée à 10 p. 1.000 ; l'émulsion est additionnée de 2 p. 1.000 de formol et conservée à la glacière. Les lapins pesant

ATTAQUE DE						COAGULATION DU LAIT	CROISSANCE EN LAIT additionnée de bœuf de méthylène (0,1 p. 100)	CROISSANCE EN MILIEU fortement chloruré (6,5 p. 100 de NaCl)	GROUPE SÉROLOGIQUE (Lancefield)
Sorbite	Mannite	Raffinose	Esculine	—	—				
—	—	—	—	+	+	+	—	—	B
+	—	—	—	+	+	—	—	—	C
+	—	—	—	—	Lente.	—	—	—	Non classables.

2,5 kg. à 3 kg. reçoivent dans les veines de l'oreille cet antigène par série de cinq ou six jours consécutifs. Chaque semaine de vaccination est suivie d'une semaine de repos. Au bout de deux mois, les lapins sont saignés à blanc.

Certains échantillons de streptocoque se montant spontanément agglutinés, la difficulté de réaliser une technique d'agglutination de ces germes à l'abri de toute critique est connue de tous. Nous nous sommes inspirés des techniques simples et rapides, utilisées notamment en Angleterre. On cultive les streptocoques en bouillon-sérum équin pendant dix-huit heures à 37° et émulsionne le culot de centrifugation de 10 c. c. de culture dans 2 c. c. d'eau salée à 10 p. 1.000. On mélange sur une lame une goutte d'émulsion et une goutte de sérum. On examine à l'œil nu et à la loupe le mélange dès qu'il a été fait, puis, après cinq minutes. Il est prudent et indispensable de ne considérer comme positives que les agglutinations indiscutablement plus accentuées avec les antisérum qu'avec les sérum de lapins normaux. Le tableau IV résume nos essais.

D'après ce tableau, la plupart des échantillons de streptocoque classique de la mammite sont agglutinables par nos sérum expérimentaux de lapin. Parmi les six échantillons déjà agglutinables par le sérum de lapin normal, trois possèdent les caractères morphologiques et bio-chimiques classiques des streptocoques de la mammite, et ne diffèrent donc des précédents que par leur agglutinabilité en sérum de lapin normal. 20 autres (12 de lait et 8 de lait) ne sont que légèrement atypiques ; seul, le dernier, Lait I, se

TABLEAU IV.

ÉCHANTILLONS microbiens	DIAGNOSTIC	AGGLUTINABILITÉ par sérum de lapin		
		traités par antigène 7 Pg	traités par antigène 14 A	normal
7 Pg		+	+	
14 A		+	+	
Pompadour		Faible.	+	Faible.
Pa 6 Ag		+	+	—
Pa 6 PD		+	+	—
Pa 18 Pg		+	+	—
Pa 18 PD		+	+	—
45 PD	Streptocoques typiques de la mammite.	+	+	—
Lait 7 PG		+	+	—
s 19		+	+	—
Duval 13 Pg		+	+	—
8a		+	+	+
4b		+	+	+
Lorel 4		+	+	—
P 29		—	—	—
8 de lait		+	+	+
12 de lait	Streptocoques atypiques de la mammite.	++	++	+
Pa 10 AD		+	+	—
4 β		—	—	—
10 γ		—	—	—
4 α	Streptocoques différent du streptocoque de la mammite.	—	—	—
Lait I		+	+	+

separe nettement du streptocoque de la mammite par ses caractères de culture. Un échantillon, Pa 10 A D, est exclusivement agglutinable par les 2 sérum de lapin et diffère, au point de vue bio-chimique, du streptocoque de la mammite, présentant au contraire les caractères de *Str. uberis*.

Restent enfin 7 échantillons, inagglutinables par les sérum anti et normal de lapin. Or un seul d'entre eux, P 29, offre les caractères classiques. *Presque tous les échantillons de streptocoques de la mammite rencontrés par nous entrent donc dans un même type sérologique.* Des recherches plus étendues en France à des époques et dans des contrées différentes conduiraient peut-être à la découverte de types sérologiques divers, ainsi qu'en Grande-Bretagne, en Allemagne et en Autriche.

Ajoutons que nos sérum de lapin précipitent les extraits chlorhydriques préparés, suivant la technique de Lancefield, à partir de quatre échantillons typiques de streptocoque de la mammite (7 Pg, 14 A, Pompadour, S 19), (tableau V). Ces mêmes sérum par contre ne précipitent pas les extraits de deux échantillons qui

TABLEAU V.

EXTRAIT streptococcique (technique de Lancefield) préparé avec :	DIAGNOSTIC	PRÉCIPITABILITÉ de l'extrait	
		par sérum 7 Pg (lapin)	par sérum 14 A (lapin)
7 Pg		+	+
14 A		++	++
Pompadour	Streptocoques typiques de la mammite.	++	++
S 19		+	+
4 z.	Streptocoques isolés du lait différent du streptocoque de la mammite.	-	-
Lait I		-	-
Martin.	Streptocoque humain (septicémie puerpérale).	-	-
Mâcon II.	Streptocoque équin (gourme)	-	-

offrent des caractères bio-chimiques et agglutinants différents, 4 z et Lait I. Au point de vue biochimique, tous deux peuvent être rangés dans les entérocoques atypiques (tableau II), au point de vue agglutinant, le premier est agglutinable par nos sérums de lapin, le deuxième, agglutinable par le simple sérum normal. L'absence de précipitabilité de ces deux germes ne saurait nous surprendre, les entérocoques étant rangés aujourd'hui dans le groupe D de Lancefield. Quant aux deux échantillons humain et équin gourmeux, rien d'étonnant non plus que nos sérums soient inactifs sur leurs extraits, le premier appartenant au groupe A et le deuxième au groupe C. Ainsi se confirme l'importance universellement admise aujourd'hui des caractères sérologiques dans la classification des streptocoques.

BIBLIOGRAPHIE

BEAUFRIÈRE, GELY et THIEULIN. *Bull. Acad. Vét. France*, 1942, **15**, 78.
 BROWN. *Monogr. Inst. Rockefeller*, 1919, n° 9.
 COTONI et FLOCH. *Ces Annales*, 1939, **62**, 133.
 DIERNHOFER. *Z. Infektionskrank. Haustiere*, 1932, **42**, 67 ; 2^e Congr. Internat. Microbiol. Londres, 1936.
 EDWARDS. *J. Comp. Path. Ther.*, 1932, **45**, 43 ; 1933, **46**, 212 ; 1934, **47**, 49 ; 1938, **51**, 250.
 GELY et THIEULIN. *Bull. Acad. Vét. France*, 1943, **16**, 338.
 GRIFFITH. *J. Hyg.*, 1926, **25**, 385 ; 1935, **34**, 547.
 KISSIG et ANGERMANN. *Z. Infektionskrank. Haustiere*, 1933, **43**, 59.

KLIMMER, HAUPT et ROOTS. *Centralbl. Bakt.*, I, Orig., 1928, **107**, 206.
LANCEFIELD. *J. Exp. Med.*, 1933, **57**, 571.
LESBOUYRIES et ADAM. *Bull. Acad. Vét. France*, 1933, **6**, 61.
LITTLE. *Stud. Rockefeller Inst.*, 1939, **113**, 463.
MINETT. *Le Lait*, 1933, **13**, 432 ; *J. Hyg.*, 1935, **35**, 504.
MINETT et STABLEFORTH. *J. Comp. Path. Ther.*, 1931, **44**, 114.
MINETT, STABLEFORTH et EDWARDS. *J. Comp. Path. Ther.*, 1929, **42**, 213 ;
1930, **43**, 165 ; 1932, **45**, 1 ; 1933, **46**, 131. — *Centralbl. Bakt.*,
I, Orig., 1931, **122**, 466.
NEVOT. *Cahiers de Médecine Vétér.*, 1941, **11**, 97.
NOCARD et MOLLEREAU. *Ces Annales*, 1887, **1**, 109.
NOTTBOHM. *Centralbl. Bakt.*, I, Orig., 1939-40, **145**, 369.
PLASTRIDGE, BANFIELD et WILLIAMS. *J. Inf. Dis.*, 1940, **66**, 202.
PLASTRIDGE et HARTSELL. *J. Inf. Dis.*, 1937, **61**, 110.
ROOTS. *Centralbl. Bakt.*, I, Orig., 1944, **151**, 270.
ROSELL. *Le Lait*, 1934, **14**, 456, 914, 1050.
SEELEMANN. *Z. Fleisch. Milchhyg.*, 1941, **51**, 211, 225, 255, 269.
SLANETZ et NAGSHKI. *J. Inf. Dis.*, 1940, **66**, 80.
STABLEFORTH. *J. Comp. Path. Ther.*, 1930, **43**, 22 ; 1932, **45**, 185 ;
2^e Congrès Internat. Microbiol. Londres, 1936. — *J. Path. Bact.*,
1937, **45**, 263 ; 1938, **46**, 21.
STABLEFORTH, EDWARDS et MINETT. *J. Comp. Path. Ther.*, 1935, **48**, 300.
STECK. *Le Lait*, 1933, **13**, 395, 571.
STECK et KAESTLER. *Schweiz. Milchzeitung*, 17 avril 1942, n° 31, 134.
STEWART. *J. Path. Bact.*, 1937, **45**, 279.
THIEULIN. *Le Lait*, 1942, **22**, 8.
ZOLLIKOFER. *Schweiz. Milchzeitung*, 7 février 1941, n° 11.

RECHERCHES SUR LES CORYNÉBACTÉRIES DE L'HOMME

par MAURICE WELSCH, G. DEMELENNE-JAMINON et J. THIBAUT.

(Institut de Bactériologie et Parasitologie.
Faculté de Médecine de l'Université de Liège.)

INTRODUCTION.

L'utilisation des milieux de culture au sang-tellurite de potassium [1, 7, 8, 9, 11, 12, 16, 17, 20, 23, 25, 31, 39, 42, 46, 52] et la distinction de trois types, *gravis*, *intermedius* et *mitis* au sein de l'espèce *Corynebacterium diphtheriae* [1] constituent d'importants progrès, théoriques et pratiques, de la bactériologie médicale [26, 28, 44, 48].

Dès 1938, nous nous sommes activement intéressés à ces questions ; malheureusement, en raison des événements internationaux, notre contribution à l'étude de ces problèmes n'a pu être publiée que sous la forme de courtes notes préliminaires [50, 52, 53].

Une revue générale de la question est publiée ailleurs par l'un de nous [48] ; dans le présent travail, nous croyons utile de faire connaître à présent, et en dépit du retard causé par la guerre, le résultat *in extenso* de nos investigations personnelles. Ceci nous paraît, en effet, d'autant plus justifié que les méthodes macroscopiques de diagnostic bactériologique de la diphtérie et la distinction des types du bacille de Loeffler ne paraissent pas avoir reçu des chercheurs d'expression française l'attention qu'elles méritent [49, 51].

Nos recherches ont tout d'abord porté sur la mise au point d'un milieu de culture de préparation simple, utilisable pour le travail de routine, capable de permettre l'identification macroscopique de *C. diphtheriae* et la distinction de ses trois types. Le milieu finalement adopté, modifié de Neill [31], est un milieu « chocolat » au sang laqué chauffé. On a signalé depuis que non seulement certaines souches de la variété *mitis* [16], mais aussi quelques souches de la variété *gravis* [47], se développent mal ou pas en présence d'hématine [21] ; ceci appelle évidemment de nouvelles recherches qui sont actuellement en cours [53 bis].

Nous avons étudié les propriétés morphologiques et biochi-

miques d'une centaine de souches de *C. diphtheriae* et d'autant de diphtéroïdes divers, dans le but de juger en connaissance de cause de la valeur réelle de certains caractères différentiels préconisés pour l'identification pratique du B. de Loeffler. Nous apportons aussi la première contribution relative à l'existence et à la distribution des types de *C. diphtheriae* en Belgique et nous donnons une description détaillée de l'aspect des divers diphtéroïdes sur milieu au sang tellurite.

Enfin, nous avons étudié la valeur *pratique* de notre milieu pour la recherche routinière du B. de Loeffler et nous décrivons la technique en usage depuis plus de cinq ans dans notre laboratoire où elle nous donne d'excellents résultats [44 bis, 50 bis].

A. — MILIEU G. C. T. ET TECHNIQUES GÉNÉRALES.

1^o MILIEU G. C. T. — Le bactériologiste qui désire étudier personnellement la valeur pratique de la méthode macroscopique pour le diagnostic de la diphtérie est, au début de son travail, extrêmement embarrassé pour choisir un milieu de culture approprié. Certes, les formules préconisées ne manquent pas ; bien au contraire, leur nombre, à lui seul, suffirait à rendre le choix difficile ; mais, de plus, les renseignements les plus divers, quant à leur valeur relative, peuvent être trouvés dans la littérature. Cependant, si on élimine, *a priori*, tous les milieux dont la préparation est longue ou compliquée, tous ceux, onéreux, qui nécessitent l'emploi de sang de petits animaux, on diminue singulièrement le champ des possibilités et le milieu décrit par Neill [31] paraît tout particulièrement indiqué pour l'usage pratique.

Nous avons utilisé une formule assez semblable à celle de cet auteur ; la modification la plus importante que nous y ayons apportée consiste à utiliser, comme source économique d'hémoglobine, du jus de caillots au lieu de sang total recueilli aseptiquement. Nous avons adopté ce procédé en raison de certaines difficultés à obtenir du sang stérile aux abattoirs.

Nous désignerons notre milieu par l'abréviation « G. C. T. » (gélose, caillots, tellurite). Il est préparé à partir des quatre constituants suivants :

a) *Bouillon nutritif* : Dissoudre à chaud :

Extrait de viande Liebig.	20 g.
Peptone de Diest	20 g.
Chlorure de sodium.	10 g.
Eau distillée pour faire	1.000 c.c.

Ajuster à pH 9 environ ; maintenir au voisinage de l'ébullition pendant trente minutes ; filtrer sur Chardin ; ajuster à pH 7.4 ; stériliser à l'autoclave (vingt minutes à 115°) par portions de 500 c. c.

Conserver en glacière. Ce bouillon ne doit plus être chauffé à une température supérieure à 100°.

b) *Extrait de caillots* : Le sang de bœuf est recueilli à l'abattoir sans précautions spéciales ; on le conserve en glacière jusqu'à coagulation et rétraction du coagulum. Le sérum est décanté, stérilisé par passage sur filtre Seitz et utilisé pour les besoins courants du laboratoire (sérum coagulé, milieu de Hiss, bouillon et gélose au sérum, etc). Les caillots, réduits en menus fragments, sont exprimés à travers un linge fin ; le jus obtenu est filtré sur papier, puis, additionné de 30 c. c. d'éther et de 30 c. c. d'acétate d'éthyle par litre pourachever le laquage ; après vingt-quatre à quarante-huit heures de séjour en glacière, le liquide, parfaitement limpide, peut être stérilisé par passage à travers filtre Seitz. Le filtrat est réparti aseptiquement en fractions de 50 c. c. et conservé en glacière ; il peut y séjourner, sans inconveniient, pendant au moins quatre à cinq mois. L'expérience nous a montré ultérieurement que la filtration n'était pas indispensable.

c) *Solution aqueuse à 1 p. 100 de tellurite de potassium* : Nous avons utilisé des sels de deux origines différentes : l'un, de la maison Kahlbaum, se dissolvait difficilement ; l'autre, de British Drug Houses, était aisément amené en solution sans qu'il fût nécessaire de recourir aux divers artifices recommandés par certains auteurs. Nous avons, par la suite, employé exclusivement ce dernier produit.

Le sel est dissous dans de l'eau distillée stérile, contenue dans un récipient stérile ; la solution ne doit pas être chauffée et il est inutile de la stériliser par filtration étant donné son pouvoir bactéricide élevé ; elle ne doit pas être vieille de plus de huit jours ; aussi, trouverait-on commode de la préparer la veille du jour où l'on se propose de faire le milieu G. C. T.

d) *Gel d'agar-agar à 5 p. 100* : L'agar, rapidement lavé à l'eau courante, est amené en pseudo-solution dans l'eau distillée à l'ébullition, puis, stérilisé à l'autoclave. Etant donné sa concentration élevée, ce gel est malaisément conservé liquéfié à 50° pendant plusieurs jours ; d'autre part, lorsqu'il est solidifié, il faut un temps assez long pour le fondre ; aussi, pour éviter ces manipulations inutiles, il est plus simple de préparer ce gel le jour même où l'on fait le milieu : au sortir de l'autoclave, on le refroidit à 50° et on l'utilise aussitôt.

L'eau gélosée est répartie en raison de 500 c. c. dans des ballons de 1 lit. 5 ou 2 litres de capacité.

Pour préparer le milieu G. C. T., on ajoute à 500 c. c. de bouillon (a) préalablement chauffé à 50°, 50 c. c. d'extrait globulaire (b) et 20 c. c. de la solution de tellurite (c) ; ensuite, ce mélange est introduit dans le ballon de 2 litres qui contient 500 c. c. d'eau gélosée (d) maintenue liquide à 50°. Le tout est placé dans un bain-marie à 50° dont la température est progressivement portée puis maintenue pendant quinze minutes à 75°. Pendant ce chauffage, il est nécessaire d'agiter fréquemment le ballon.

Le mélange est, enfin, transvasé aseptiquement dans un flacon de Wolff stérile et tiédi à 50°, dont la tubulure inférieure est munie d'un ajutage de caoutchouc avec pince à forcipressure. On peut ainsi distribuer le milieu rapidement et aseptiquement, tout en évitant les bulles d'air, soit en tubes qui seront solidifiés en position inclinée, soit en boîtes de Petri [30].

Le milieu G. C. T. est opaque, de couleur chocolat et très finement granuleux ; il peut être conservé en glacière pendant deux à trois semaines ; il est utile de le laisser deux ou trois jours à la température du laboratoire avant l'emploi, de telle sorte qu'il soit légèrement desséché.

2^o ISOLEMENT, ORIGINE ET CLASSIFICATION DES CORYNÉBACTÉRIES ÉTUDIÉES. — Avant d'étudier la valeur pratique du milieu G. C. T., il était indispensable de connaître sous quel aspect il présenterait le B. diptérique, ou plutôt les trois types de ce germe, d'une part, les diptéroïdes et les autres microbes du rhino-pharynx, d'autre part.

a) *Les germes banaux du rhino-pharynx.* — Quelques écouvillons, chargés de produits prélevés dans la gorge ou le nez de divers sujets malades ou sains, nous ont rapidement appris que, mises à part les corynèbactéries, peu de germes étaient capables de se multiplier, en vingt-quatre ou quarante-huit heures, sur milieu G. C. T. Seuls furent observés avec quelque fréquence le *Micrococcus catarrhalis* et des levures ; le premier donne des colonies très caractéristiques, très noires d'emblée, saillantes et très grossièrement granuleuses (aspect mûriforme) ; les secondes donnent des colonies bombées, lisses, circulaires, petites et blanches après vingt-quatre heures, qui grossissent et deviennent parfois légèrement grisâtres en quarante-huit heures.

Notre attention a donc pu se porter immédiatement sur les corynèbactéries. Dans ce but, nous avons procédé à l'isolement de nombreuses souches à partir de produits infectieux parvenus au Service provincial de la Diphtérie.

b) *Techniques d'isolement.* — 1^o Un petit nombre de souches ont été isolées par repiquage sur gélose ordinaire, en boîtes de Petri, des primo-cultures obtenues sur sérum coagulé par la technique classique. Cette méthode ne nous a donné de bons résultats que lorsque l'examen microscopique de la culture sur sérum coagulé révélait la présence de corynèbactéries en très grand nombre. On sait, en effet, que les germes banaux, inhibés dans la primo-culture sur milieu sélectif, reprennent sur gélose simple une croissance normale dont l'exubérance peut masquer le développement des bacilles recherchés.

2^o De meilleurs résultats ont été obtenus en repiquant la primo-culture sur sérum coagulé non plus sur gélose mais sur milieu inhibiteur, soit sérum coagulé, soit G. C. T. en boîtes de Petri. Dans ce cas, les colonies isolées sont presque toutes des corynèbactéries et elles

sont aisément purifiées définitivement par isolement sur gélose ordinaire.

3^o Enfin, dans un certain nombre de cas, les écouvillons ont été directement ensemencées sur G. C. T. et les colonies de corynèbactéries obtenues ont été purifiées par isolement sur gélose simple.

On sait qu'il est particulièrement difficile d'obtenir des corynèbactéries en culture réellement pure en raison de l'aptitude des germes de ce groupe à former des suspensions grumeleuses ; que, d'autre part, il est parfois malaisé de contrôler microscopiquement la pureté d'une souche, en raison du polymorphisme de certains membres de ce groupe. Aussi, l'attention la plus minutieuse a-t-elle été apportée au contrôle permanent de nos souches pendant la durée des recherches ; elles ont été conservées sur gélose ordinaire, qui révèle le mieux l'existence d'une contamination éventuelle ; en outre, l'observation de tout comportement anormal au cours des études relatives à la fermentation, de tout changement morphologique, macroscopique ou microscopique, a-t-elle été immédiatement suivie d'un nouvel isolement sur gélose. Dans quelques cas, celui-ci nous a permis de séparer deux ou même trois espèces distinctes à partir d'une culture considérée comme pure jusqu'alors.

c) *Origine des souches.* — Nos isolements ont été faits à partir de 328 primo-cultures différentes et nous ont donné 247 souches distinctes. Parmi celles-ci, 89 ont été identifiées comme *C. diphtheriae*, et 158 comme diphtéroides. Un certain nombre de ces souches n'ont pas été utilisées pour l'ensemble des recherches,

TABLEAU I. — Origine des souches.

ORIGINE		NOMBRE DE CORYNEBACTÉRIES					
		Total		<i>C. diphtheriae</i>		Diphtéroides	
Anatomique	Clinique	Isolées	Etudiées	Isolées	Etudiées	Isolées	Etudiées
Gorge.	Malades.	71	59	46	46	27	13
	Convalescents.	27	20	20	18	7	2
	Porteurs.	60	49	41	41	49	38
Nez.	Malades.	27	20	1	1	26	19
	Convalescents.	2	1	0	0	2	1
	Porteurs.	40	30	6	6	34	24
Oreille.	Malades.	18	9	3	1	15	8
	Malade.	1	1	1	1	0	0
	Malade.	1	1	1	1	0	0
Total		247	190	89	85	158	105

soit que nous les ayons volontairement écartées, soit, pour quelques-unes, que nous les ayons perdues au cours du travail. Le tableau I montre la répartition des souches dans ces diverses catégories et selon leur origine anatomique (gorge, nez, oreille, conjonctive, pus pleural) et clinique (malades, plus ou moins suspects de diphtérie ; convalescents de cette affection ; sujets sains, porteurs présumés de B. de Loeffler).

Les trois dernières catégories du tableau demandent quelques explications complémentaires. Les prélèvements faits dans les oreilles reçus au laboratoire pendant la durée de nos recherches ont tous été étudiés ; dans tous ces cas, il s'agissait de sujets faisant une otite au cours de leur diphtérie et où le clinicien suspectait l'« otite diphtérique » ; dans chaque primo-culture, l'examen microscopique révélait la présence, en abondance, de corynébactéries, morphologiquement très semblables au bacille de Loeffler. On voit que l'isolement et l'identification complète des germes n'ont confirmé ce diagnostic, purement microscopique, que trois fois sur dix-huit.

Un seul prélèvement fait au niveau de la conjonctive nous est parvenu ; il s'agissait cliniquement de conjonctivite diphtérique. Enfin, un bacille diphtérique, isolé à partir d'un pus pleural, obtenu après thoracectomie dans un cas de pleurésie purulente, a été joint à notre collection. Ce germe était virulent.

Dans 8 cas, une même primo-culture nous a fourni, après isolement, deux ou même trois corynébactéries distinctes ; dans tous ces cas il s'agissait de l'association d'un bacille dépourvu d'activité fermentaire (groupe de *C. hofmanni*), avec tantôt un bacille de Loeffler (quatre fois), tantôt un (trois fois) ou deux (une fois) autres diphtéroïdes.

d) *Classification des souches.* — La division de nos souches en deux grands groupes, bacilles diphtériques d'une part, diphtéroïdes d'autre part, a été réalisée essentiellement sur la base des réactions de fermentation. Les travaux de Barratt [2, 3] et ceux de Okell et Baxter [2, 33] ont définitivement établi la constance des réactions de fermentation de *C. diphtheriae*, virulent ou non, et la possibilité de distinguer, grâce à elles, cet organisme des autres corynébactéries. Les recherches ultérieures de Noble et Knacke [32], Jensen et Falk [22], Frobisher [15] ont complètement confirmé ces observations.

Les résultats divergents rapportés par certains auteurs sont dus soit à un isolement insuffisant des souches étudiées, soit à l'emploi de substances fermentescibles impures, soit à l'altération des hydrates de carbone lors de la stérilisation à l'autoclave, soit enfin à l'utilisation d'un milieu de culture incapable de permettre le développement rapide et abondant des corynébactéries.

Nous basant sur ces travaux, nous avons classé nos souches en *C. diphtheriae* et diphtéroïdes ; puis, ceux-ci ont été répartis en sections et en groupes selon la terminologie de Barratt [3].

Une bonne technique de recherche des fermentations étant particulièrement importante pour assurer des résultats convenables, nous exposerons, tout d'abord, avec les détails nécessaires, la méthode utilisée.

TECHNIQUES DE RECHERCHE DES FERMENTATIONS. — a) *Milieu de base* : sérum de Hiss. On prépare de l'eau peptonée comme suit :

Peptone de Diest	0,5 g.
Phosphate bi-sodique	0,4 g.
Eau distillée pour faire	100 c.c.

Dissoudre à chaud, porter quinze minutes à l'ébullition ; filtrer sur Chardin ; ajuster à pH 7,6 ; stériliser à l'autoclave.

A 100 c. c. de cette eau peptonée stérile, ajouter aseptiquement 25 c. c. de sérum de bœuf, stérilisé par passage à travers filtre Seitz. Chauffer ce mélange pendant trente minutes à 100°, trois jours consécutifs. Eprouver la stérilité par séjour de quarante-huit heures à 37°.

b) *Solutions d'hydrates de carbone* : Solutions aqueuses à 20 p. 100 des produits Merck suivants : glucose, galactose, saccharose, maltose, lactose, mannite, stérilisées par filtration sur bougie Chamberland L III. Solutions aqueuses à 10 p. 100 des produits British Drug Houses suivants ; dextrine, amidon, glycogène, stérilisées à l'autoclave.

c) *Indicateur* : teinture de tournesol stérilisée par filtration sur bougie Chamberland L III.

Pour rechercher les fermentations, on ajoute aseptiquement au sérum de Hiss (a) une quantité suffisante de solution hydrocarbonée (b) pour obtenir une concentration finale de 1 p. 100 avec les mono- et di-saccharides, de 0,5 p. 100 avec les polysaccharides, et *quod satis* de la solution d'indicateur (c). On répartit en tubes à essai stériles et on éprouve la stérilité par séjour de quarante-huit heures à 37°.

Après ensemencement, on observe les cultures journalièrement pendant huit à dix jours, exceptionnellement même plus longtemps, et on note le virage de l'indicateur et la coagulation éventuelles. Des tubes témoins, non ensemencés, doivent rester inchangés.

D'autres techniques simplifiées ont été utilisées tout d'abord mais ne nous ont donné que de mauvais résultats ; celle-ci, par contre, nous a permis de retrouver exactement les mêmes activités pour des souches examinées à différentes reprises ; les résultats ont été très constants, même pour le lactose et la dextrine. Dans quelques cas où les propriétés fermentaires paraissaient ou anormales, ou irrégulières, l'isolement de la souche étudiée nous a toujours révélé l'existence d'un mélange de corynèbactéries ou, plus rarement, la présence d'un germe contaminant.

B. — ETUDE DES PROPRIÉTÉS DE *Corynebacterium diphtheriae*.

1° PROPRIÉTÉS GÉNÉRALES COMMUNES AUX TROIS TYPES. — a) *Fémentation des hydrates de carbone usuels*. — Ont été considérées

comme *C. diphtheriae* toutes les souches acidifiant, sans production de gaz, le milieu de Hiss additionné de : glucose, galactose, maltose ou dextrine, mais inactives sur : lactose, saccharose et mannite.

Deux souches ne fermentaient que très faiblement le galactose, et, bien qu'elles fussent actives vis-à-vis de la dextrine, on aurait pu hésiter à les classer comme *C. diphtheriae* ou comme diphtéroïdes du groupe III. L'inoculation sous-cutanée au cobaye a prouvé leur virulence et tranché la question.

Mair [27] signale deux cas analogues et Emmerson [14] un.

Une quinzaine de souches ne se distinguaient du bacille diphtérique que par la non fermentation de la dextrine ; leurs propriétés morphologiques, microscopiques ou macroscopiques (sur gélose et sur G.C.T.), ont confirmé qu'il s'agissait, sans aucun doute, de diphtéroïdes des groupes V et Va. La fermentation de l'amidon et du glycogène sera discutée plus loin.

b) *Production d'indol.* — La recherche de l'indol, dans les cultures âgées de quatre jours, au moyen du réactif d'Erlich (p-di-méthyl-amino-benzaldéhyde), est restée négative avec les 85 souches examinées. Une culture d'*Escherichia coli*, dans les mêmes conditions, donnait une réaction très nettement positive.

La même recherche, pratiquée avec le réactif de Salkowski (acide sulfurique et nitrite de potassium), a donné un résultat positif avec la moitié des souches environ. On sait que Palmirski et Orlowski, 895, Escallon et Sirce, 1908, etc., ont signalé le même résultat avec des cultures âgées de trois semaines, mais que Blumenthal, 1898, Zipfel, 1912, etc., n'ont obtenu que des résultats négatifs avec des cultures de cinq jours. On sait aussi que la réaction négative au réactif d'Ehrlich et positive avec celui de Salkowski indique, non pas la présence d'indol, mais bien celle d'acide indol-acétique (Hewlett, 1900, 1901 ; Frieber, 1921).

c) *Cultures en gélose glucosée profonde.* — Toutes nos souches croissaient dans la hauteur du tube de Veillon.

d) *Fermentation de l'urée.* — Puschel [41] a signalé que *C. diphtheriae* ne fermentait pas l'urée (301 souches), tandis que *C. Hofmanni* attaquait cette substance (178 souches). Kleinsorgen et Commichau [24] ont préconisé l'utilisation de cette propriété pour le diagnostic pratique de la diphtérie. Pour vérifier la généralité de ce caractère, nous l'avons recherché pour chacune de nos souches. Les résultats de fermentation anormaux étant, en général, plus fréquents sur milieux solides, nous avons utilisé un milieu liquide préparé, cependant, autant que possible, comme la gélose de Kleinsorgen et Commichau.

TECHNIQUE. — *Milieu de base* : Sérum de Hiss décrit plus haut.

Indicateur : rouge de créosol filtré sur bougie Chamberland L III.

Solution aqueuse d'urée à 20 p. 100 : Stérilisée par filtration.

Solution de cystine à 1 p. 100 : Dissoudre 1 g. de soude caustique dans 10 c. c. d'eau distillée, puis y ajouter 1 g. de cystine ; compléter ensuite à 100 c. c. avec de l'eau distillée. Stériliser à l'autoclave.

Solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 1 p. 100 : Stérilisée à l'autoclave en tube scellé.

A 95 c. c. de milieu de Hiss, ajouter aseptiquement 10 c. c. de la solution d'urée, 1,25 c. c. de la solution de cystine, 4 c. c. de la solution d'acide et *quod satis* d'indicateur. Répartir en tubes à essai, éprouver la stérilité par séjour de quarante-huit heures à 37°.

La lecture du virage alcalin qui indique la présence d'uréase est faite après vingt-quatre puis quarante-huit heures.

Tous nos *C. diphtheriae* sont inactifs sur l'urée.

2^e PROPRIÉTÉS SPÉCIALES AUX TROIS TYPES DE *C. diphtheriae*. — a) *Morphologie des colonies de C. diphtheriae sur G.C.T.* — Les 85 souches de *C. diphtheriae* ont été ensemencées chacune sur G.C.T., en boîtes de Pétri, de façon à obtenir des colonies séparées. Chaque souche étudiée n'a montré qu'un seul et même aspect morphologique : il n'y avait donc aucun mélange de types dans notre collection ; l'examen des souches, répété à plusieurs reprises, pendant plusieurs mois, a établi la constance des caractères des colonies. Pour l'ensemble de la collection, trois aspects distincts ont été observés qui correspondent aux trois types : *gravis*, *mitis* et *intermedius* [1]. Ces types représentent respectivement 71,7 p. 100, 25,9 p. 100 et 2,4 p. 100 des 85 souches étudiées.

La description des différentes colonies est illustrée par les fig. 1, 2 et 3 de la planche.

Type « gravis » (fig. 1). — Après vingt-quatre heures de culture, ces colonies ont un diamètre de 2 à 4 mm. Elles sont grisâtres avec un centre noir. Tandis que la région centrale est saillante, la périphérie reste plate. Le contour de la colonie est crénelé, sa forme générale circulaire. La colonie est granuleuse avec quelques striations radiaires.

Après quarante-huit heures d'incubation, la taille des colonies atteint 5 à 8 mm. de diamètre. Elles sont généralement devenues plus sombres ; la striation radiaire est plus accusée, et, avec l'aspect lobulé du contour, donne l'aspect caractéristique de « daisy-head ». Toutefois, pareille régularité n'est pas toujours observée.

Après incubation plus prolongée, le relief de la colonie s'atténue ; elle est alors noire avec périphérie plus claire, bombée, granuleuse, sans striation radiaire. Dans quelques cas, cet aspect, moins caractéristique, est atteint après quarante-huit heures, sans que le stade « daisy-head » ait été observé.

Ensemencées en stries sur G. C. T., en tubes inclinés, les souches *gravis* donnent une culture abondante, gris foncé, dont les bords, brusquement aplatis, sont plus clairs et découpés, dont la structure est fortement granuleuse.

Type « mitis » (fig. 2). — Après vingt-quatre heures de culture, ces colonies sont légèrement plus petites que celles de *gravis* ; elles ont

un diamètre de 1 à 3 mm. Leur coloration générale est plus sombre. Elles sont régulièrement bombées, à contour circulaire régulier, parfaitement lisses, homogènes et brillantes. Avec attention, on constate l'existence d'un mince liséré périphérique plus clair.

Après quarante-huit heures, les *mitis* ont atteint un diamètre de 5 à 6 mm. sans que leur aspect général se soit notablement modifié. Le liséré clair est, généralement, plus net.

Après incubation plus longue, ces colonies perdent plus ou moins leur régularité ; le bord devient lobulé ; la surface se plisse ou se strie ; l'aspect général se rapproche de celui des colonies vieilles de *gravis*. Ensemencées en stries sur G. C. T., les souches *mitis* donnent une culture abondante, noire, lisse, brillante, bombée, à bord régulier.

Type « intermedius » (fig. 3). — Après vingt-quatre heures de culture, les colonies sont notablement plus petites que celles des deux autres types, leur diamètre est de 1 mm. environ. Elles sont noires, coniques, granuleuses, à bord crénelé. Après quarante-huit heures d'incubation, leur diamètre atteint 3 mm. On constate, alors, que la région centrale forme une papille surélevée, que le bord, fortement incliné, est plus clair que le restant de la colonie. L'aspect général est celui d'une petite colonie *gravis*, mais sans trace de radiation radiaire et sans zone périphérique plate.

Après incubation prolongée, ces colonies perdent, plus ou moins, leur aspect granuleux.

Ensemencés en stries sur G. C. T. les *intermedius* donnent une culture grêle, sombre, granuleuse, à bord abrupt.

b) *Morphologie des trois types sur sérum coagulé et gélose simple*. — Sur ces milieux, il est malaisé de différencier les divers types de colonies. Toutefois, lorsqu'on est averti, on remarque l'aspect généralement *rough* du *gravis* opposé à l'aspect *smooth* du *mitis* ; de même, on constate le développement moins abondant de l'*intermedius*. Ces caractères sont plus faciles à reconnaître sur gélose ordinaire que sur sérum coagulé.

c) *Aspect des cultures des différents types en bouillon ordinaire*. — Les souches, ensemencées en bouillon ordinaire, sont placées à l'étuve dans des conditions convenables pour éviter toute secousse capable de masquer la production du voile. Les cultures sont examinées journalement pendant six à huit jours avec le minimum de manipulations.

D'après les travaux de l'école de Leeds [1, 26], le *gravis* typique donne une culture granuleuse qui se dépose rapidement, et, en même temps, forme un voile épais, résistant, très adhérent. Le *mitis*, au contraire, donne une culture trouble homogène avec, parfois, un voile qui reste mince et fragile. Enfin, l'*intermedius* donne une culture granuleuse fine qui, rapidement, tombe au fond du tube et laisse le milieu limpide.

La totalité de nos souches, ayant sur G.C.T. la morphologie de *mitis* ou d'*intermedius*, ont donné des cultures en bouillon

conformes à la description correspondante ci-dessus. Par contre, 13 p. 100 des souches à morphologie de *gravis* ont donné en bouillon une culture ayant les caractères propres au type *mitis*.

d) *Fermentation des polysaccharides*. — D'après l'école de Leeds [1, 26], le *gravis* seul fermente l'amidon et le glycogène, tandis que les *mitis* et *intermedius* sont inactifs à l'égard de ces substances. Des souches atypiques, *gravis* incapables de fermenter les polysaccharides [57], *mitis* [6] et *intermedius* [43] capables de les fermenter ont cependant été décrites.

Dans notre collection, une seule souche à morphologie de *mitis* fermentait l'amidon et le glycogène mais, par contre, 29 p. 100 des souches à morphologie de *gravis* n'attaquaient pas ces corps. Contrairement à Frobischer [15], nous n'avons pas observé d'avantage à l'emploi de glycogène plutôt qu'à celui d'amidon.

e) *Pouvoir hémolytique*. — D'après l'école de Leeds [1, 26], l'*intermedius* n'est jamais hémolytique et le *gravis* rarement, tandis que le *mitis* l'est généralement.

Nous avons recherché ce caractère chez les souches de notre collection par la technique de Hammerschmidt [18]. Aux cultures en bouillon âgées de quarante-huit heures, on ajoute 0,25 c. c. d'émulsion d'hématies à 2 p. 100 ; on porte deux heures à 37°, puis une nuit en glacière, avant de faire la lecture. Nous avons observé que 68 p. 100 de nos *mitis* sont hémolytiques, tandis que nos deux *intermedius* et 85 p. 100 de nos *gravis* ne provoquent pas d'hémolyse.

f) *Morphologie microscopique*. — Cultivés sur sérum coagulé ou milieu de Loeffler, les *gravis* apparaissent, d'après l'école de Leeds [1, 26], comme des bacilles assez courts, avec des grains métachromatiques peu développés ; les *mitis* comme des éléments très longs avec grains de Babès nombreux et volumineux ; les *intermedius* comme des éléments zébrés (barred forms [27]).

Nous avons ensemencé nos souches sur sérum coagulé à partir de colonies typiques isolées sur G.C.T. Des frottis de ces cultures, âgées de dix-huit heures, ont été examinés après fixation à l'alcool et coloration au bleu de toluidine. Nous n'avons pas observé de relations nettes entre l'aspect des colonies sur G.C.T. et la morphologie microscopique des bacilles cultivés sur sérum. Par contre, l'examen des frottis obtenus à partir de cultures âgées de vingt-quatre heures sur G.C.T. nous a montré que, dans ces conditions, 85 p. 100 des cultures *gravis* montrent des bacilles courts et moyens, tandis que 77 p. 100 des *mitis* montrent des bacilles très longs et granuleux.

g) *Production de toxine et virulence*. — Des circonstances indépendantes de notre volonté ne nous ont pas permis d'étudier ces propriétés et leurs relations avec le type.

On sait que le *gravis* est moins bon producteur de toxine

in vitro que le *mitis* [37, 38]; par contre, il provoque une réaction locale plus intense [34] et reste toxigène en milieu riche en fer [29]. Chez le cobaye, l'inoculation de *gravis* n'est qu'exceptionnellement suivie de survie, tandis que 10 à 20 p. 100 des *mitis* et 10 p. 100 des *intermedius* ne sont pas pathogènes dans ces conditions [26, 36].

h) *Typage définitif*. — Parmi les caractères que nous avons étudiés, trois ont une importance particulière pour la distinction des types : aspect des colonies sur G.C.T., caractères des cultures en bouillon, fermentation des polysaccharides; par contre, le pouvoir hémolytique et l'aspect microscopique ne sont que des caractères d'importance secondaire [35].

Parmi nos souches *mitis*, une seule souche doit être considérée comme atypique, car elle fermente l'amidon et le glycogène. Les deux seuls *intermedius* isolés sont typiques à tous points de vue, sauf en ce qui concerne leur aspect microscopique. Par contre, parmi les souches ayant l'aspect de *gravis* sur G.C.T., 29,5 p. 100 sont atypiques en ce qu'elles sont incapables de fermenter les polysaccharides; parmi elles, 16,4 p. 100 donnent en bouillon une culture typiquement *gravis* et appartiennent au type IV de Wright et Christison, tandis que 13,1 p. 100 donnent en bouillon une culture à aspect de *mitis* et sont peut-être des *mitis* « rough », selon la suggestion de Clauberg et alli [43].

Parmi les souches isolées à partir de sujets malades, 74 p. 100 ont, sur G.C.T., une morphologie de *gravis*, 60 p. 100 étant de vrais *gravis* et 14 p. 100 étant atypiques. Chez les convalescents, nous observons 89 p. 100 de *gravis*, dont 61 p. 100 sont atypiques. Enfin, chez les porteurs sains, on trouve 47 p. 100 de *gravis*, tous typiques, et 53 p. 100 de *mitis*.

3^o CONCLUSIONS DES RECHERCHES RELATIVES A *C. diphtheriae*. — 1^o Le milieu G.C.T. permet de distinguer les trois types morphologiques de *C. diphtheriae*.

2^o Le diagnostic macroscopique du type est confirmé, par la recherche des autres caractères distinctifs, pour 43 *gravis*, 21 *mitis* et 2 *intermedius*, c'est-à-dire pour 66 souches sur 85 étudiées, soit 77,6 p. 100. Si on ajoute à ces souches typiques les 16 *gravis* non fermentant, type IV, qui ont généralement la même signification que les *gravis* vrais, le diagnostic macroscopique du type est confirmé dans 89,4 p. 100 des cas.

3^o L'accord général des caractères étudiés montre la réelle signification bactériologique de la distinction des types.

4^o Dans la région de Liège, le rôle du type *intermedius* est minime, le type *gravis* est dominant (71,7 p. 100), mais le *mitis* n'est pas rare (25,9 p. 100).

5^o Les observations relatives à l'origine des souches : rareté

du *mitis* chez les convalescents, fréquence du *gravis* chez les porteurs sains, sont en accord avec le rôle clinique généralement attribué à ces deux types.

6° La fréquence relative des *gravis* non fermentant chez les convalescents opposée à celle des *gravis* typiques chez les malades est signalée.

(*A suivre.*)

SUR LA SÉROTHÉRAPIE DE L'INTOXICATION BOTULIQUE EXPÉRIMENTALE DU COBAYE

par R. LEGROUX et JEAN C. LEVADITI.

(Institut Pasteur.)

Toute sérothérapie antitoxique est plus préventive que curative : les maladies toxiques telles la diphtérie, le tétanos, la dysenterie, se manifestent d'abord par les signes cliniques de l'infection qui permettent l'emploi de l'antitoxine spécifique avant l'apparition des signes de localisation de la toxine, élaborée au niveau des foyers infectieux. Mais dans la maladie botulique la toxine, pré-formée à l'extérieur, est introduite seule dans l'organisme et les premiers signes cliniques sont ceux de l'atteinte des cellules du système nerveux.

Il n'est donc pas possible d'injecter le sérum spécifique au malade au moment où la toxine est sécrétée par la bactérie, comme dans la diphtérie, ni à titre préventif comme pour le tétanos, mais seulement après l'apparition des premiers symptômes de botulisme, à un moment où la dose totale de toxine a pénétré dans l'organisme.

Or les cliniciens s'accordent pour traiter l'intoxication botulique humaine par le sérum et lui reconnaissent une action thérapeutique. Étant donné la rareté du botulisme leur expérience ne s'est pas établie sur un grand nombre de cas, et à côté de résultats favorables comme ceux de Nonnenbruch [1], de Dickson et Howitt [2], de Burke, Helder et Pischel [3], de Pinkerton et Krobalski [4] on a observé des cas mortels : Dorendorf [5], Caskey [6], Jennings, Haas et Jennings [7], Benard, Rambert et Pestel [8], etc..., malgré la sérothérapie.

Quelle est exactement l'activité du sérum au cours de l'intoxication botulique expérimentale ? Telle est la question que nous nous sommes posée.

Nous avons répété avec la toxine botulique une variante des expériences de Behring et Wernicke [9] et de Dönnitz [10]. La voici (Tableau I) : 3 lapins reçoivent 1/10 de centimètre cube de cette toxine qui leur est injectée par voie intraveineuse ; cette dose tue l'animal en deux heures. Chaque lapin recevra, à des temps plus ou moins rapprochés de l'injection toxique, une injection intraveineuse de 1,5 c. c. de sérum spécifique.

TABLEAU I. — $1/10^{\circ}$ de centimètre cube de toxine B; voie veineuse. 2 c.c. de sérum injecté par la même voie.

	TÉMOIN	LAPINS TRAITÉS PAR LE SÉRUM		
		En même temps	1/2 heure	1 heure
Durée de l'incubation . . .	1 h. 30	—	3 h.	2 h.
Durée de la maladie . . .	30 min.	—	3 h.	45 min.
La toxine tue en . . .	2 h.	—	6 h.	2 h. 45

Le lapin qui reçoit l'injection de sérum quelques instants après celle de la toxine reste parfaitement bien portant. Aucun symptôme n'apparaît. Le sérum est injecté à un deuxième lapin une demi-heure après la toxine : les premiers symptômes apparaissent après une incubation de trois heures et c'est trois heures plus tard que l'animal meurt ; il présente donc une survie de quatre heures par rapport au témoin. Enfin lorsque le sérum est injecté une heure après la toxine, la durée de la période d'incubation et celle de la maladie apparente sont à peine prolongées : le lapin meurt en deux heures quarante-cinq au lieu de deux heures.

Cette expérience confirme ainsi les données classiques de la sérothérapie, qui veulent que l'action curative de l'antitoxine soit d'autant moins efficace que le temps qui s'écoule entre l'introduction de la toxine et l'injection de l'antitoxine est plus long. Cette inefficacité de la sérothérapie antitoxique tardive s'explique par la fixation connue depuis Behring [41], Roux et Borrel [42], Madsen [43], de la toxine sur les cellules sensibles.

I. DOSE ET VOIE D'INTRODUCTION DE LA TOXINE. — Pour adapter cette expérience aux conditions physio-pathologiques du botulisme humain, il a fallu intoxiquer les animaux par voie digestive et non plus par voie intraveineuse ou sous-cutanée. Il a fallu également utiliser des doses de toxine voisines ou égales à la dose minima mortelle ; dans ces conditions, l'influence de la réceptivité individuelle intervient considérablement. Ceci nous a obligés à utiliser un assez grand nombre d'animaux afin de respecter les règles expérimentales imposées par les lois du calcul de probabilité. L'intoxication digestive est déterminée par la toxine, qui est mélangée à une petite quantité de farine et est introduite avec une spatule dans l'arrière-bouche du cobaye. 40 cobayes ont été ainsi intoxiqués par lots de 5 avec des dilutions successives comprises entre 1/1.000 et 1/50.000. La D. M. M., c'est-à-dire la dose létale 50 p. 100 s'est établie pour notre échantillon de toxine B à 1/5.000 de centimètre cube. Notre toxine de type A est actuellement moins

active à l'égard du cobaye et la dose minima mortelle se place vers le 1/100 de centimètre cube (1).

Les concentrations immédiatement supérieures à celles-ci provoquent la mort de la presque totalité des animaux. Les concentrations inférieures ne tuent que certains d'entre eux ; la majorité des cobayes, même après une aphonie passagère, résiste à la toxine.

II. VOIES D'INJECTION DU SÉRUM. — La seconde expérience permet de vérifier la voie la plus favorable à l'introduction du sérum anti-botulique dans l'organisme du cobaye. Une dose unique de (2 c. c.) a été injectée six heures après l'injection de 1/200 de centimètre cube de toxine botulique de type B, soit 25 D. M. M., à des lots de 5 cobayes par les voies intracardiaque, intramusculaire, sous-cutanée ou intrapéritonéale. Dans ces conditions, tous les animaux sont protégés lorsque le sérum est injecté dans le cœur ou dans le muscle et quelques-uns d'entre eux également lorsqu'il est injecté par les autres voies. La voie intracardiaque et la voie intramusculaire ont donc été adoptées dans les expériences suivantes.

III. DÉLAIS D'INJECTIONS DU SÉRUM. — Restait à faire varier le moment auquel le sérum est injecté. Pour cela une expérience préliminaire a été réalisée sur des lots de 2 cobayes seulement tous intoxiqués par voie digestive avec 1/200 de centimètre cube de toxine B. Ces cobayes reçoivent par voie intracardiaque 2 c. c. de sérum : cinq heures, neuf heures, dix heures après avoir ingéré la toxine botulique (tableau II). Les 6 témoins sont morts de dix-neuf à vingt-trois heures après l'ingestion, soit en vingt et une heures en moyenne. Les cobayes qui reçoivent le sérum cinq heures après l'ingestion restent parfaitement normaux. Ceux qui le reçoivent neuf ou quinze heures après l'ingestion meurent après une survie de vingt-cinq à trente heures et enfin ceux qui l'ont reçu vingt heures après l'ingestion (à un moment où les cobayes bavaient et étaient aphones) sont morts comme les témoins.

Par conséquent nous retrouvons là l'efficacité totale du sérum, injecté par injection unique, au début de la période d'incubation ; son efficacité partielle lorsqu'il est injecté au milieu de cette période et enfin son inefficacité au moment où l'intoxication expérimentale est pleinement constituée.

Pensant que la dose de toxine botulique était peut-être encore trop importante nous avons eu recours à des doses encore plus faibles.

(1) Ces mêmes échantillons de toxine sont au moins 1.000 fois plus actifs lorsqu'ils sont injectés par voie sous-cutanée : la toxine B tue au 1/500.000^e et la toxine A au 100.000^e de centimètre cube.

TABLEAU II. — **1/10^e de centimètre cube de toxine B; per os.**
2 c. c. de sérum; voie intracardiaque.

	TÉMOINS	LE SÉRUM EST INJECTÉ			
		à la 5 ^e heure	à la 9 ^e heure	à la 15 ^e heure	à la 20 ^e heure
		—	—	—	—
0 et 10 heures.	VVVVVVV	VV	VV	VV	VV
10 et 20 heures.	VVV +++	VV	VV	VV	V+
20 et 30 heures.	+++	VV	V+	V+	+
30 et 40 heures.	VVV	V	V	V	
40 et 50 heures.	VVV	V	V	V	
50 et 60 heures.	●●	+	+	+	

Cobaye vivant, V; cobaye mort, +; survie indéfinie, ●.

Des lots de 5 cobayes ont reçu par voie digestive 1/1.000 de centimètre cube de toxine B, soit 5 D. M. M. Puis sept heures ou quinze heures plus tard on leur injecte par voie intramusculaire ou intracardiaque 1 c. c. de sérum.

Le tableau III emprunte la même notation que le tableau II,

TABLEAU III. — **1/1.000 de centimètre cube de toxine B. 1 c. c.**
de sérum injecté par voie intracardiaque ou intramusculaire.

Voie d'inoculation .	TÉMOINS	LE SÉRUM EST INJECTÉ			
		à la 7 ^e heure		à la 15 ^e heure	
		Intra- cardiaque	Intra- musculaire	Intra- cardiaque	Intra- musculaire
Nombre de cobayes.	10	5	5	5	5
1 ^{er} jour	VVVVVVVVVVV	VVVVV	VVVVV	VVVVV	VVVVV
2 ^e jour	VVVVVVVVVV++	VVVVV	VVVV +	VVVVV	VVVVV
3 ^e jour	V +++++++	VVVVV +	VVVV	VV +++	VVVVV
		H		H H H	
4 ^e jour	V	VVVV	VVVV	V +	VVV ++
5 ^e jour	V	VVVV	VVVV	V	VV +
6 ^e jour	V	VVVV	VVV +	V	VV
7 ^e jour	V	VVVV	VVV	V	VV
8 ^e jour	V	VVVV	V++	V	V +
9 ^e jour	●	●●●●	●	●	●

Cobaye vivant, V; cobaye mort, +; cobaye mort d'hémosthorax, H; survie indéfinie, ●.

mais les quelques cobayes ayant reçu le sérum par voie intracardiaque qui sont morts sans lésions botuliques par suite d'hémo-

thorax sont marqués par la lettre (H). Il ressort de l'examen de ce tableau que le sérum, injecté par voie intracardiaque cinq heures après le repas toxique, protège complètement 4 cobayes sur 5, et qu'injecté par la voie intramusculaire, il n'entraîne qu'une survie des animaux. Le sérum injecté à la quinzième heure permet d'obtenir des survies moins prolongées, mais ne s'est montré, comme entre les mains de Dickson et Howitt [2] ou de Dack et Wood [14], doué d'aucun pouvoir de protection certain.

L'expérience identique effectuée avec la toxine de type A a donné un résultat analogue ; il est inutile d'en reprendre les détails que résume le tableau IV.

TABLEAU IV. — **1/10 de centimètre cube de toxine A, per os.**
1,5 c.c. de sérum injecté par voies intracardiaque ou intramusculaire.

Voie d'inoculation,	TÉMOINS	LE SÉRUM EST INJECTÉ			
		à la 7 ^e heure		à la 15 ^e heure	
		Intra-cardiaque	intra-musculaire	Intra-cardiaque	Intra-musculaire
Nombre de cobayes.	10	5	5	5	5
1 ^{er} jour.	++++++	VVVVV	VVVVV	VVVVV	VVVVV
2 ^e jour.		VVVV +	VVVV +	VV + ++	VVVVV
3 ^e jour.		VVV +	VVV	V +	V + + + +
4 ^e jour.		VVV	VVV	+	+
5 ^e jour.		VV +	VVV +		
6 ^e jour.		VV	VVV		
7 ^e jour.		VV	VVV		
8 ^e jour.		V +	VV +		
9 ^e jour.		●	●●		

Cobaye vivant, V; cobaye mort, +; survie indéfinie, ●.

CONCLUSION. — La sérothérapie du botulisme expérimental du cobaye intoxiqué par voie buccale permet d'éviter la mort de l'animal lorsque le sérum est injecté avant l'apparition des premiers symptômes *objectifs* de botulisme. Même pour des doses voisines de la dose minima mortelle il est impossible d'éviter la mort du cobaye si l'injection du sérum n'est pas faite dans la première moitié de la période d'incubation. Passé ce délai on obtient seulement une survie de l'animal.

Sans tirer de ces résultats expérimentaux une conclusion ferme, applicable à l'intoxication botulique humaine, pour laquelle les injections de sérum sont réitérées, il est possible d'expliquer la différence d'action de la sérothérapie en clinique et au laboratoire. Il suffit pour cela d'invoquer la différence des symptômes

observés. Chez l'homme les symptômes subjectifs précèdent les symptômes objectifs. Chez le cobaye les symptômes objectifs sont les seuls qu'il soit possible d'observer. Le début de la maladie apparente est donc plus précoce chez l'homme que chez le cobaye, ce qui permet d'établir une sérothérapie plus hâtive et partant plus efficace.

Quoi qu'il en soit il faut retenir de l'ensemble de ces faits que la sérothérapie du botulisme a d'autant plus de chance d'être efficace qu'elle est pratiquée plus précocement et, au moins pour la première injection, par voie d'absorption rapide : intraveineuse ou intramusculaire.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] NONNENBRUCH (W.). *Münch. med. Wochenschr.*, 1917, **64**, 1409.
- [2] DICKSON (E.) et HOWITT (B.). *J. Am. Med. Assoc.*, 1920, **74**, 718.
- [3] BURKE, HELDER et PISCHEL. *Arch. internat. Med.*, 1921, **27**, 265.
- [4] PINKERTON (W.) et KROBALSKI. *Med. J. a. Record*, 1924, **120**, 117.
- [5] DORENDORF. *Deutsch. med. Wochenschr.*, 1917, **43**, 1531 et 1554.
- [6] CASKEY, in WEINBERG (M.) et GINSBOURG (R.) *Bull. Inst. Pasteur*, 1926, **24**, 969.
- [7] JENNINGS (C.), HAAS (E.) et JENNINGS (A.). *J. Am. Med. Assoc.*, 1920, **74**, 77.
- [8] BÉNARD (H.), RAMBERT (P.) et PESTEL (M.). *La Presse Médicale*, 1943, 22 mai, 283.
- [9] VON BEHRING et WERNICKE. *Zeitschr. Hyg.*, 1892, **42**, 10.
- [10] DONITZ. *Arch. intern. Pharmacodynamie*, 1899, **5**, 425 et *Deutsch. med. Wochenschr.*, 1897, n° 17, 428.
- [11] VON BEHRING. *Fortschr. der Med.*, 1897, **15**, 1.
- [12] ROUX (E.) et BORREL (A.), *Ces Annales*, 1898, **12**, 225 et Congrès de Madrid, avril 1898.
- [13] MADSEN (T.). *Zeitschr. Hyg.*, 1899, **32**, 214 et 239.
- [14] DACE (G.) et WOOD (W.). *J. Inf. Diseases*, 1928, **42**, 209.

**ACTION COMPARÉE DE LA CHALEUR
ET DE L'IRRADIATION α
SUR LE POUVOIR ANTIGÉNIQUE
ET LES PROPRIÉTÉS DU BACILLE TYPHIQUE**

par H.-R. OLIVIER et P. BONÉT-MAURY (*).

*(Institut du Radium, Laboratoire Curie et Chaire médicale
de Dijon. Service du Prof. OLIVIER.)*

L'irradiation α agit sur la cellule vivante de façon très progressive, très nuancée, toute différente de celle des autres agents physiques comme, par exemple, la chaleur ; suivant l'expression de A. Lacassagne (1) les rayonnements ionisants réalisent une « sorte de microdissection qui aboutit à une dissociation des fonctions cellulaires ». L'expérience montre que c'est la fonction de multiplication qui est atteinte généralement la première ; nous avons montré (2) qu'on peut mettre à profit cette particularité pour supprimer définitivement la virulence d'un germe pathogène sans altérer d'autres propriétés, comme la mobilité ou la respiration. L'action de l'irradiation apparaît, avec des doses convenables, non pas *bactéricide* comme celle des antiseptiques ou de la chaleur, mais bien *bactériostatique*, comme celle des sulfamides. Avec cette différence, cependant, que la bactériostase des sulfamides est temporaire, réversible, tandis que celle des radiations ionisantes est définitive, irréversible. L'utilisation pour l'immunologie des bactéries irradiées nécessite l'appréciation de leur pouvoir vaccinant. Il était important d'évaluer le pouvoir antigénique des bactéries irradiées ; nous avons choisi comme terme de comparaison les bactéries chauffées, dont les propriétés immunisantes ont été bien étudiées pour de nombreux germes (3). Avec *B. coli*, on a montré que des suspensions irradiées conservent un pouvoir immunisant au moins égal à celui des germes chauffés (3).

(*) Communication présentée à la séance du 1^{er} juin 1944 de l'Association des Microbiologistes de Langue Française.

(1) A. LACASSAGNE. *Arch. Inst. du Radium*, décembre 1934, 228.

(2) P. BONÉT-MAURY et H.-R. OLIVIER. *C. R. Acad. Sci.*, 1939, **209**, 459.

(3) P. BONÉT-MAURY, C. LEVADITI et H. NOURY. *Bull. Acad. Méd.*, 1943, **127**, 420.

Le bacille typhique, ou plus exactement les bacilles de ce groupe (Eberth, para A, para B), permettent une comparaison commode des propriétés respectives des bactéries chauffées ou irradiées et tout particulièrement de leur pouvoir antigénique, apprécié par le séro-diagnostic. Le tableau I résume ces propriétés.

TABLEAU I.

	PROLI-FÉRATION	MOBILITÉ	RESPIRA-TION	VIRULENCE	POUVOIR antigénique
Bacilles chauffés .	0	0	0	0	+
Bacilles irradiés .	0	+	+	0	+

La persistance de la respiration des germes irradiés non proliférants s'observe, comme pour *B. coli*, avec le classique respiromètre de Warburg. Avec les bacilles du groupe typhique la persistance de la mobilité est très nette : il est pratiquement impossible de distinguer les suspensions irradiées des témoins, par ce critère.

Quant au pouvoir vaccinant, nous l'avons, en collaboration avec MM. Tétard et Blanchon (4), étudié par la mesure des agglutinines (somatique O ou flagellaire H) développées chez le lapin ou chez l'homme après inoculation d'une quantité identique de germes chauffés ou irradiés.

POUVOIR ANTIGÉNIQUE POUR LE LAPIN.

Les lapins sont séparés en deux groupes égaux : l'un reçoit du vaccin TAB chauffé (5) et l'autre le même nombre de germes (provenant de trois souches personnelles) irradiés par les rayons α du radon, suivant la technique décrite (2) à la dose de 14 μ cd/cc. Après vérification de la stérilité bactériologique des germes irradiés, chaque lapin reçoit par voie intraveineuse 4 injections (1/10, 2/10 ; 1/4 et 1/4 de centimètre cube) à huit jours de distance. On recherche, à intervalles réguliers, le taux limite de la séro-agglutination suivant la technique classique (9).

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau II, dans lequel les taux moyens d'agglutination représentent la moyenne arithmétique des taux individuels.

(4) H.-R. OLIVIER, E. BLANCHON et E. TÉTARD. *Bull. Acad. Méd.*, 1944 (sous presse). — E. TÉTARD. *Thèse de doctorat en médecine* (sous presse).

(5) Préparé par l'Institut Pasteur. Obtenu par chauffage une heure à 56°, ce vaccin renferme par centimètre cube 1 milliard 800 millions de B. d'Eberth, 1 milliard 200 millions de para A et 1 milliard 200 millions de para B.

TABLEAU II. — Pouvoir antigénique pour le lapin.

ANTIGÈNE	BACILLE D'ÉBERTH (O + H)		PARA A (O + H)		PARA B (O + H)		II TYPHIQUE		O TYPHIQUE	
	Chauffé	Irradié	Chauffé	Irradié	Chauffé	Irradié	Chauffé	Irradié	Chauffé	Irradié
<i>Expérience n° 1 (8 animaux, première injection le 11 juin):</i>										
18 juin :										
Nb. d'aggl. posit.	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4		
Taux moyen d'agglutination	1/160	1/160	1/100	1/160	1/114	1/200				
13 août :										
Nb. d'aggl. posit.	4/4	4/4	0/4	4/4						
Taux moyen d'agglutination	1/29	1/33	1/90							
13 novembre :										
Nb. d'aggl. posit.			0/4	4/4						
Taux moyen d'agglutination			1/29							
<i>Expérience n° 2 (4 animaux, première injection le 22 septembre):</i>										
29 septembre :										
Nb. d'aggl. posit.	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2	1/2	2/2	
Taux d'agglutination	1/50	1/67	1/240	1/200	1/125	1/343		1/50	1/133	1/145
43 octobre :										
Nb. d'aggl. posit.	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	
Taux d'agglutination	1/50	1/67	1/480	1/530	1/800	1/750		1/50	1/600	1/680
24 octobre :										
Nb. d'aggl. posit.	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2	1/2	2/2	
Taux d'agglutination	1/50	1/100	1/267	1/480	1/530	1/530		1/50	1/400	1/480
2 novembre :										
Nb. d'aggl. posit.	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2	2/2	
Taux d'agglutination	1/50	1/0	1/433	1/267	1/80	1/200			1/133	1/240

Le pouvoir antigénique du radiovaccin se montre ainsi, sur le lapin, au moins égal à celui du thermovaccin et il apparaît pour le para A beaucoup plus durable, pour l'expérience n° 1 (fig. 1). Les différences observées sont en faveur des bacilles irradiés dans 81 p. 100 des cas.

POUVOIR ANTIGÉNIQUE POUR L'HOMME.

Ces mêmes expériences ont été répétées sur l'homme, mais en utilisant cette fois la même suspension initiale pour préparer les deux vaccins. La suspension renfermant les bactéries vivantes (à

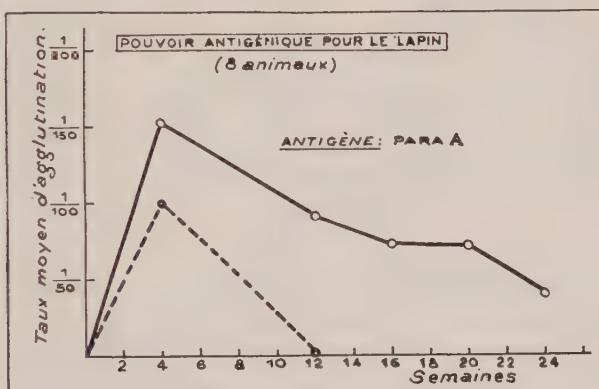


FIG. 1. — Expérience numéro 1.

la même concentration que le vaccin TAB utilisé pour les lapins) est séparée en deux portions : l'une est chauffée une heure à 58° et l'autre irradiée par les rayons α du radon (6). Chaque sujet reçoit l'injection de 3/10 de centimètre cube par voie sous-cutanée, de l'un ou l'autre vaccin, à huit jours d'intervalle. Les bacilles irradiés donnent des réactions locales analogues à celles des germes chauffés, et pas de réaction générale. On pratique régulièrement les séro-agglutinations : Eberth (O+H), para A (O+H), Eberth à antigène 0, Eberth à antigène H (7). Les expériences ont

(6) La comparaison énergétique des deux agents est délicate car on ne peut calculer directement l'énergie thermique réellement utilisée pour l'inactivation des bactéries. Tout ce que l'on peut dire c'est que la radio-inactivation, avec les rayons α , nécessite l'apport de $7,6 \times 10^6$ ergs par centimètre cube, tandis que le chauffage de 15° à 55° demande $1,7 \times 10^9$ ergs par centimètre cube, soit 225 fois plus d'énergie.

(7) Souches aimablement mises à notre disposition par M. Bonnefoi.

porté sur 38 sujets et dans le tableau III sont résumés les résultats des deux dernières.

Ici encore le pouvoir vaccinant des germes irradiés, apprécié par la séro-agglutination, se révèle au moins égal au premier examen, à celui des bactéries chauffées. Une analyse plus attentive des données numériques montre que les différences dans les taux d'agglutination observées sont en faveur du radio-vaccin dans 77 p. 100 des cas et du thermo-vaccin dans 8,6 p. 100 seulement.

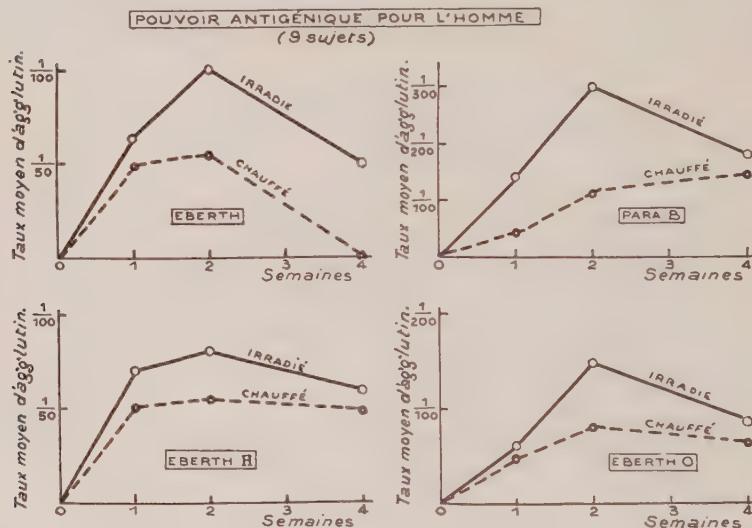


FIG. 2. — Expérience numéro 4.

La figure 2 traduit sous forme graphique certaines données du tableau III, relatives à l'expérience n° 4.

COMPARAISON GÉNÉRALE DES RÉSULTATS.

Pour résumer numériquement toutes ces données de façon commode, nous avons calculé, pour les deux vaccins, la moyenne générale des taux d'agglutination, correspondant aux différents antigènes (Tableau IV) ; en y joignant les pourcentages de séro-diagnostic positifs observés, on dispose de trois éléments numériques de comparaison, pour l'appréciation du pouvoir antigénique : la fréquence des séro-diagnostic positifs, le taux moyen d'agglutination et la fréquence des résultats (taux d'agglutination) en faveur de chaque vaccin.

L'examen du tableau IV fait alors ressortir de façon très nette

TABLEAU III. — Pouvoir antigénique pour l'homme.

ANTIGÈNE	BACILLE D'ÉBERTH		PARA A		PARA B		H TYPHIQUE		O TYPHIQUE	
	Chauffé	Irradié	Chauffé	Irradié	Chauffé	Irradié	Chauffé	Irradié	Chauffé	Irradié
<i>Expérience n° 4 (9 sujets, première injection le 9 octobre) :</i>										
16 octobre :										
Nb. d'aggl. posit.	3/5	5/5	3/5	3/5	2/5	2/5	4/5	5/5	3/5	5/5
Taux d'agglutination	1/50	1/63	1/50	1/50	1/50	1/50	1/50	1/50	1/50	1/60
25 octobre :										
Nb. d'aggl. posit.	5/5	5/5	4/5	5/5	5/5	5/5	4/5	5/5	5/5	5/5
Taux d'agglutination	1/55	1/100	1/50	1/63	1/420	1/300	1/57	1/80	1/83	1/452
9 novembre :										
Nb. d'aggl. posit.	0/4	4/5	2/4	3/5	3/4	5/5	1/4	1/5	2/4	5/5
Taux d'agglutination	1/50	1/50	1/400	1/70	1/50	1/482	1/50	1/60	1/66	1/90
<i>Expérience n° 5 (10 sujets, première injection le 22 novembre) :</i>										
29 novembre :										
Nb. d'aggl. posit.	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	2/5	4/5	5/5	5/5
Taux d'agglutination	1/50	1/50	1/50	1/93	1/430	1/434	1/740	1/30	1/57	1/410
13 décembre :										
Nb. d'aggl. posit.	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	5/5	5/5	5/5
Taux d'agglutination	1/50	1/50	1/275	1/370	1/230	1/780	1/80	1/67	1/350	1/200
4 janvier :										
Nb. d'aggl. posit.	0/4	2/4	5/5	5/5	5/5	5/5	1/5	2/5	5/5	5/5
Taux d'agglutination	1/50	1/50	1/90	1/90	1/330	1/50	1/280	1/50	1/43	1/240
8 février :										
Nb. d'aggl. posit.	0/4	0/4	2/5	4/5	4/5	4/5	0/5	0/5	2/5	3/5
Taux d'agglutination			1/50	1/50	1/90	1/50	1/57	1/50	1/50	1/80

TABLEAU IV.

que le pouvoir antigénique des germes irradiés apparaît supérieur à celui des bactéries chauffées et ce, pour chacun des trois éléments de comparaison.

Pour condenser à l'extrême le résultat de cette comparaison on peut dire que *dans environ 80 p. 100 des cas les germes irradiés manifestent un taux d'agglutination, pour tous les antigènes, supérieur à celui des bactéries chauffées* ; leur pouvoir antigénique apparaît égal dans 12 p. 100 environ et inférieur dans 8 p. 100 seulement de tous les cas observés.

CONCLUSIONS.

L'irradiation α des bacilles du groupe typhique (Eberth, para A, para B) permet d'obtenir des germes avirulents ayant conservé certaines des propriétés des germes vivants (mobilité, respiration) et un pouvoir antigénique supérieur à celui des bacilles chauffés. Il se confirme ainsi que *l'irradiation α (8), dissociant complètement virulence et pouvoir antigénique, constitue une méthode générale pour l'obtention de vaccins d'un type nouveau, conservant la plupart des propriétés des germes vivants, hors la virulence.*

(8) Et vraisemblablement l'irradiation par les rayons X et les rayons U. V.

(9) N. FIESSINGER, H.-R. OLIVIER et M. HERBAIN. *Les diagnostics biologiques*, Maloine (1944).

ÉTUDE DE LA CONSOMMATION DU GLUCOSE PAR LES VIBRIONS CHOLÉRIQUES “ NON PROLIFÉRANTS ”

par JUDITH BLASS.

(*Institut Pasteur,
Laboratoire des Instituts Pasteur coloniaux.*)

Le travail présent sur la consommation du glucose par les vibrions cholériques lavés « non proliférants » se rattache aux travaux de Noël Bernard et Jean Gallut ayant trait à un nouveau mode de préparation de la toxine cholérique [1, 2, 3].

Ces auteurs utilisent pour la préparation de la toxine cholérique des vibrions lavés, récoltés sur gélose nutritive en boites de Roux après seize heures d'étuve à 37°, qu'ils mettent en suspension soit en bouillon Ramon [4] glucosé à 5 p. 1.000, soit en eau physiologique glucosée à 5 p. 1.000, à raison de 8 à 10 mg. de microbes (poids sec) par centimètre cube (la culture de 3 boites de Roux dans 20 c. c.). A cette concentration qui est environ 60 fois plus élevée que celle obtenue en bouillon par une culture abondante, les microbes ne se multiplient plus (« microbes non proliférants »). Au bout de quatre heures de séjour à l'étuve à 37° on centrifuge pour séparer les corps microbiens. Le liquide surnageant est toxique à la dose de 0,25 c. c. pour le cobaye de 250 g. et de 0,05 c. c. pour la souris blanche de 15 g. par injection intrapéritonéale.

Cette technique est beaucoup plus simple et plus rapide que celle publiée précédemment par Martin Hahn et Julius Hirsch [5] qui obtiennent une toxine cholérique de même valeur que celle obtenue par Noël Bernard et Jean Gallut en cultivant des vibrions cholériques pendant vingt-quatre heures à trois jours dans un milieu glucosé dont ils ajustent constamment le pH par addition de soude diluée.

Rappelons que dans la méthode classique de préparation de la toxine cholérique on obtient une toxine active au bout de sept jours environ de culture de vibrions en bouillon Ramon non glucosé.

Dans les 2 techniques permettant une diffusion rapide de la toxine dans le milieu, celle de Martin Hahn et Julius Hirsch, ainsi que celle de Noël Bernard et Jean Gallut, la présence du glucose est essentielle.

Cela nous a amené à effectuer une étude de la consommation

du glucose par les vibrions cholériques non proliférants, afin de préciser les conditions dans lesquelles la toxine cholérique préparée avec ces mêmes vibrions apparaît dans le milieu.

Nous avons étudié :

1^o La quantité maxima de glucose qu'une concentration donnée de microbes est capable de consommer en bouillon Ramon glucosé à des taux croissants.

2^o La consommation du glucose en fonction du temps en bouillon Ramon glucosé à un taux fixe de 5 p. 1.000 pour différentes concentrations microbiennes.

3^o La consommation du glucose en fonction du milieu.

4^o Les produits de fermentation du glucose des vibrions non proliférants en bouillon Ramon.

Pour doser le glucose nous avons utilisé la micro-méthode de Fontès et Thivolle. Nous prélevions pour chaque dosage 1 c. c. de suspension bactérienne que nous additionnions immédiatement de 0,1 c. c. d'acide sulfurique normal afin d'arrêter la consommation. Les corps microbiens étaient séparés par centrifugation.

1^o Le taux de glucose adopté empiriquement pour la préparation de la toxine cholérique était de 5 p. 1.000. Les essais que nous avons effectués ont pleinement justifié cette teneur de 5 p. 1.000, car elle représente la quantité maxima de glucose que les microbes peuvent consommer en bouillon Ramon, quelle que soit leur concentration, celle-ci variant entre 4 mg. par 1 c. c. de suspension (1 boîte de Roux dans 20 c. c. de bouillon) et 21 mg. par centimètre cube de suspension microbienne.

Les vibrions cholériques étaient récoltés sur boîtes de Roux après seize heures de culture à l'étuve et mis en suspension en bouillon Ramon glucosé quatre heures à 37° suivant la technique de préparation de la toxine cholérique.

Nous avons étudié la consommation du glucose en bouillon Ramon glucosé à des taux variant entre 4 à 15 p. 1.000 pour les 3 concentrations microbiennes suivantes. 1^o 4 mg. par centimètre cube ; 2^o 10 mg. par centimètre cube ; 3^o 21 mg. par centimètre cube.

Nous avons suivi parallèlement à la variation de la teneur en glucose la variation du pH du milieu. Le pH initial du milieu était toujours 8,0.

Les résultats sont présentés dans les tableaux ci-dessous.

Il résulte de nos essais que la teneur maxima de glucose consommé pour les 3 concentrations microbiennes étudiées varie entre 3,7 et 5 g. par litre, quelle que soit la teneur en glucose initiale du bouillon. L'examen des variations du pH accompagnant la consommation du glucose explique ce fait. La consommation dans les conditions de l'expérience de 4 g. par litre de glucose environ entraîne une chute de pH de 8,0 à 5,8. A pH 5,8 les vibrions meurent et la consommation ultérieure du glucose est arrêtée.

TABLEAU I. — Variations de la teneur en glucose et du pH au cours de 4 heures à 37°. — I. Concentration microbienne : 4 mg. de vibrions secs par centimètre cube de suspension (1 boîte de Roux dans 20 c.c. de bouillon).

GLUCOSE initial p. 1.000		1 HEURE	2 HEURES	3 HEURES	4 HEURES	GLUCOSE consommé (g. par litre)
9,0 . . .	Glucose pH	6,5 6,2	5,2 5,9	4,6 5,8	4,6 5,8	4,4
11,8 . . .	Glucose pH	8,9 6,4	7,9 6,0	7,6 5,8	7,6 5,8	4,1
14,1 . . .	Glucose pH	6,4	10,1 6,0	10,1 5,8	10,1 5,8	4,0

TABLEAU II. — Variations de la teneur en glucose et du pH au cours de 4 heures à 37°. — II. Concentration microbienne : 10 mg. de vibrions secs par centimètre cube de suspension (3 boîtes de Roux dans 20 c.c. de bouillon).

GLUCOSE initial p. 1.000		2 HEURES	4 HEURES	GLUCOSE consommé (g. par litre)
4,2	Glucose pH	0,6 5,8	0,5 5,8	3,7
8,0	Glucose pH	4,2 5,8	4,2 5,8	3,8
12,0	Glucose pH	8 5,8	8 5,8	4,0

TABLEAU III. — Variations de la teneur en glucose et du pH au cours de 4 heures à 37°. — III. Concentration microbienne : 21 mg. de vibrions secs par centimètre cube de suspension.

GLUCOSE initial p. 1.000	1 HEURE	4 HEURES	GLUCOSE consommé (g. par litre)
13,6	9,6	8,6	5,0

La diffusion rapide de la toxine cholérique semble être en relation avec la mort massive des vibrions à ce pH, car on peut la mettre en évidence, dès que le pH 5,8 s'installe. Cependant une

immersion des vibrios cholériques dans le bouillon Ramon ajusté préalablement à pH 5,8 avec de l'acide chlorhydrique n'a pas permis à Noël Bernard et Jean Gallut d'obtenir une toxine cholérique. Les conditions créées par la fermentation du glucose semblent être indispensables à la diffusion rapide de la toxine.

2° En étudiant la consommation du glucose en fonction du temps en bouillon Ramon glucosé à 5 p. 1.000 pour différentes concentrations microbiennes nous avons constaté que si la teneur en glucose consommé finalement est la même, quelle que soit la concentration microbienne, la courbe des variations de la teneur en glucose en fonction du temps, ainsi que la courbe correspondante des variations du pH varient d'une concentration à l'autre.

Nous avons étudié les 4 concentrations suivantes :

I. 2 mg. de vibrios secs par centimètre cube de suspension.

II. 3,5 mg. de vibrios secs par centimètre cube de suspension.

III. 4,5 mg. de vibrios secs par centimètre cube de suspension.

IV. 9 mg. de vibrios secs par centimètre cube de suspension.

C'est la concentration IV qui a été considérée comme la plus favorable pour la préparation de la toxine.

Nous avons également calculé la vitesse horaire de consommation du glucose en fonction du temps, ainsi que la vitesse moyenne par mg. de microbes secs.

Les tableaux et les courbes ci-dessous représentent les résultats obtenus.

Il ressort des résultats indiqués ci-dessus que la consommation

TABLEAU. IV. — **Variations de la teneur en glucose et du pH au cours de 7 heures à 37°.**

POIDS de vibrios secs par c. c.		1 HEURE	2 HEURES	3 HEURES	4 HEURES	5 HEURES	7 HEURES
2 mg.	Glucose p. 1.000	5	3,8	2,5	1,6	1,2	0,5
	pH	7,2	6,8	6,4	6,0	5,9	5,9
3,5 mg.	Glucose p. 1.000	3,8	2,7	1,3	0,9	0,3	0,3
	pH	7,2	6,4	6,2	5,8	5,8	5,8
4,5 mg.	Glucose p. 1.000	2,1	1,2	1,0	0,5	0,3	0,3
	pH	6,4	6,0	5,8	5,8	5,8	5,8
9 mg.	Glucose p. 1.000	1,6	0,5	0,3	0,3	0,3	0,3
	pH	6,2	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8

TABLEAU V. — **Vitesses horaires de consommation du glucose en fonction du temps.** — (Quantités de glucose consommées en une heure par le poids donné de vibrions secs).

POIDS de vibrions secs par c.c.	VITESSE 1 ^{re} heure	VITESSE 2 ^e heure	VITESSE 3 ^e heure	VITESSE 4 ^e heure	VITESSE moyenne à pH > 6,0	VITESSE moyenne par mg. de vibrion à pH > 6,0
I. 2 mg. . . .	0	1,2	1,3	0,9	0,8	0,4
II. 3,5 mg. . .	1,2	1,1	1,4	0,4	1,25	0,4
III. 4,5 mg. . .	2,9	0,9	0,2	0,2	1,8	0,4
IV. 9 mg . . .	3,4	1,1	0,2	0	3,4	0,4

du glucose et la chute du pH correspondante sont d'autant plus rapides que la concentration microbienne est plus élevée. Les



FIG. 1. — Variations de la teneur en glucose au cours de sept heures à 37°. Courbe 1, 2 mg. de vibrions par centimètre cube de suspension. Courbe 2, 3,5 mg. de vibrions par centimètre cube de suspension. Courbe 3, 4,5 mg. de vibrions par centimètre cube de suspension. Courbe 4, 9 mg. de vibrions par centimètre cube de suspension.

courbes des pH ont à peu près la même allure que les courbes de consommation du glucose. Le pH 5,8 est atteint au bout de cinq heures à l'étuve à 37° pour la concentration I, après quatre heures pour la concentration II, après trois heures pour la concentration III, et au bout de deux heures pour la concentration IV.

Pour la concentration de 2 mg. de vibrions secs par centimètre cube, on a observé un « seuil de consommation ». La consommation ne commence qu'après une heure à l'étuve à 37°. Cette phase

correspond probablement à la phase de phosphorylation de la fermentation lactique.

La vitesse horaire moyenne de consommation du glucose par mg. de vibrions secs est la même pour les 4 concentrations données dans le même intervalle des pH — le pH variant de 8,0 à 6,2 ou 6,0, c'est-à-dire au cours de quatre heures pour la concentration I, au cours de trois heures pour la concentration II, au cours de deux heures pour la concentration III, et au cours de la première heure pour la concentration IV. Elle est de 0,4 mg. environ.

Noël Bernard et Jean Gallut ont trouvé pour la concentration IV 15 p. 100 de germes morts au bout d'une heure à l'étuve à 37°,

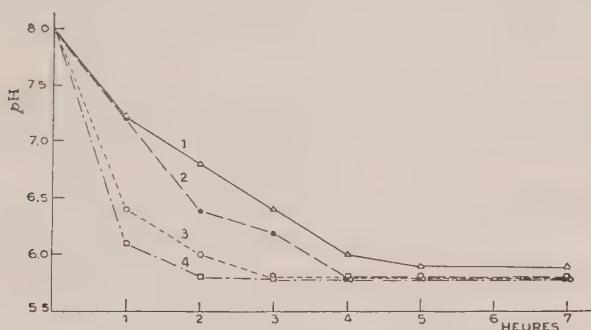


FIG. 2. — Variations du pH au cours de sept heures à 37°. Courbe 1, 2 mg. de vibrions par centimètre cube de suspension. Courbe 2, 3,5 mg. de vibrions par centimètre cube de suspension. Courbe 3, 4,5 mg. de vibrions par centimètre cube de suspension. Courbe 4, 9 mg. de vibrions par centimètre cube de suspension.

le chiffre calculé de vitesse comporte donc une légère erreur par défaut. J. Hirsch a trouvé pour les vibrions proliférants le chiffre de 0,5 mg. [6].

3° Noël Bernard et Jean Gallut ont réussi à obtenir la toxine cholérique non seulement en bouillon Ramon glucosé, mais aussi en milieu synthétique de Kemal Moukthar et en eau physiologique glucosée, quoique d'une manière moins régulière, qu'en bouillon Ramon. Nous avons donc étudié le taux de consommation du glucose, ainsi que les variations du pH en ces deux milieux, et nous avons comparé ces résultats avec ceux obtenus en bouillon Ramon dilué au 1/2 et en bouillon Ramon.

Voici la composition du milieu synthétique de Kemal Moukthar :

Phosphate de soude ($\text{PO}_4 \text{ Na}_3$)	8 g.
Asparagine	4 g.
Lactate d'ammoniaque	6 g.
Chlorure de sodium	5 g.
Eau	1.000 c. c.

Le tableau VI présente les résultats obtenus.

TABLEAU VI. — **Variations de la teneur en glucose et du pH au cours de quatre heures à 37°.**

NATURE DU MILIEU	POIDS des vibrions secs par c.c.	0 HEURE			2 HEURES			4 HEURES			TENEUR EN AZOTE du milieu p. 100
		Glucose p. 1.000	pH	Glucose p. 1.000	pH	Glucose p. 1.000	pH	Glucose p. 1.000	pH	Glucose p. 1.000	
Eau physiologique glucosée . . .	10 mg.	5	4,5	4,5	0,5						0
		p. 1.000	8,4	5,4	5,4						
Milieu synthétique de Kemal Moukthar	11 mg.	5	2,8	2,8	2,2						0,2
		p. 1.000	8,2	6,2	6,2						
Bouillon Ramon dilué au 1/2. . .	8 mg.	4	2,8	2,8	2,2						0,5
		p. 1.000	8,2	6,2	6,2						
Bouillon Ramon.	8 mg	5	1,1	0,8	4,2						1,0
		p. 1.000	8,2	5,8	5,8						

Le taux de consommation du glucose dépend du pouvoir-tampon du milieu, car ainsi que nous l'avons déjà dit, l'acidification du milieu produite par la fermentation du glucose provoque la mort des vibrions et arrête la consommation ultérieure. Dans l'eau physiologique glucosée qui n'est pas tamponnée, le taux de consommation de glucose est très faible, de 0,5 g. par litre. En milieu synthétique de Kemal Moukthar, le taux de consommation est la moitié de ce qu'il est en bouillon Ramon et le même qu'en bouillon Ramon dilué au 1/2. Nous avons représenté sur le tableau VI la teneur en azote des milieux utilisés.

Nous avons démontré que ce sont principalement les substances azotées du bouillon Ramon, ainsi que l'asparagine du milieu de Kemal Moukthar qui jouent le rôle des substances tampons du milieu, car en ajoutant au milieu synthétique de Kemal Moukthar 4 p. 100 d'asparagine de façon à obtenir la teneur en azote total de 1,1 p. 100, comparable à celle du bouillon Ramon, nous avons réussi à relever le taux de consommation de 2,2 à 4,7 p. 1.000. Le tableau VII ci-dessous présente ce résultat.

Nous avons comparé le pouvoir-tampon des milieux utilisés en déterminant les courbes de titration potentiométrique, ainsi que

TABLEAU VII. — Variations de la teneur en glucose et du pH au cours de quatre heures à 37°.

NATURE DU MILIEU	POIDS des vibrions secs par c. c.	Glucose p. 1.000	0 HEURE			2 HEURES			4 HEURES			GLUCOSE CONSUMMÉ par litre	TENEUR EN AZOTE du milieu p. 100
			5	4	0,3	7,8	6,2	6,2	4,7				
Milieu synthétique de Kemal Moukthar + 4 % d'asparagine.	9 mg.	pH										4,1	

les courbes dérivées de coefficients tampon. Pour calculer le coefficient tampon, nous avons utilisé la formule suivante :

$$\text{Coefficient tampon } t = \frac{q \cdot n}{v \cdot \Delta \text{ pH}}$$

(q centimètres cubes d'acide de normalité n ajoutés dans v centimètres cubes de solution pour une variation Δ pH admise positive).

On voit que les courbes de coefficients tampon du milieu synthé-

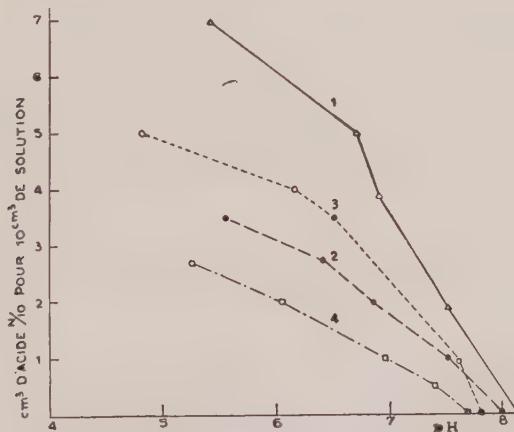


FIG. 3. — Courbes de titration potentiométrique. Courbe 1, bouillon Ramon glucosé à 5 p. 1.000. Courbe 2, bouillon Ramon dilué au 1/2 glucosé à 5 p. 1.000. Courbe 3, milieu synthétique de Kemal Moukthar glucosé à 5 p. 1.000, additionné de 4 p. 100 d'asparagine. Courbe 4, milieu synthétique de Kemal Moukthar glucosé à 5 p. 1.000.

tique de Kemal Moukthar et du bouillon Ramon dilué au 1/2 se trouvent toutes les deux au-dessous de deux autres courbes : celle

du bouillon Ramon et celle du milieu synthétique additionné de 4 p. 100 d'asparagine.

4^o Pour analyser les produits de fermentation du glucose en bouillon Ramon des vibrions cholériques lavés non proliférants, nous avons utilisé le bouillon toxique après 10 apports de germes.

Rappelons la technique employée par Noël Bernard et Jean Gallut pour la préparation de ce bouillon enrichi en toxine [1] :

On renouvelle dans le même bouillon les apports successifs de germes vivants dans les mêmes proportions. On opère alors sur 250 à 500 c. c. de bouillon. Quatre heures après chacun des apports, le milieu de culture, débarrassé des corps microbiens, par centrifugation, ramené

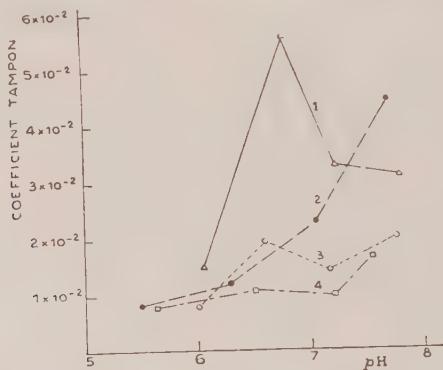


FIG. 4. — Courbes des coefficients tampon. Courbe 1, bouillon Ramon glucosé à 5 p. 1.000. Courbe 3, bouillon Ramon dilué au 1/2 glucosé à 5 p. 1.000. Courbe 2, milieu synthétique de Kemal Moukthar glucosé à 5 p. 1.000, additionné de 4 p. 100 d'asparagine. Courbe 4, milieu synthétique de Kemal Moukthar glucosé à 5 p. 1.000.

à la teneur de 5 gr. de glucose p. 1.000, réajusté à pH = 8, est réensemencé avec des germes vivants lavés dont la masse correspond à 8 à 10 mg. pour 1. c. c.

Ce bouillon est particulièrement riche en produits de fermentation, la quantité de glucose consommé étant de 39 g. par litre (3,9 g. par litre de glucose consommé en moyenne après chaque apport).

Voici la technique employée pour l'analyse des produits de fermentation du glucose.

1^o *Distillation en milieu alcalin* :

60 c. c. de bouillon toxique filtré sont additionnés de 7 c. c. de soude normale. On distille en recueillant le distillat dans un mélange de glace et de sel.

On trouve dans le distillat *des traces d'aldéhydes* (réactif de Schiff : légère recoloration ; réactif de Tollens : précipité noir ; réactif de Nessler : précipité rouge brun).

On constate l'absence des cétones et la présence de *l'alcool éthylique* (réaction d'iodoforme positive, réduction du réactif au chromate de potassium).

2^o *Distillation en milieu acide des acides volatils avec entraînement par la vapeur d'eau :*

Le résidu de la distillation alcaline est acidifié à pH = 5,5 avec de l'acide sulfurique N. On distille avec entraînement par la vapeur d'eau. On recueille 300 c. c. de distillat.

On effectue *l'analyse des acides volatils* d'après la méthode micro-chimique de Behrens et Kley modifiée [6].

On évapore à sec le distillat après l'avoir neutralisé avec de l'eau de chaux. On reprend le résidu par de l'alcool absolu à trois reprises. Le résidu insoluble est séché au bain-marie pour éliminer l'alcool, puis repris par quelques gouttes d'eau distillée. On identifie dans la solution *l'acide formique* par les cristaux de formiate de cérium et *l'acide acétique* par les cristaux d'acétate double d'uranium et de sodium.

On constate dans la solution alcoolique des acides volatils, l'absence des acides propionique, butyrique et valérianique.

3^o *Analyse des acides fixes :*

Le résidu après distillation des acides volatils est épuisé par de l'éther dans une fiole à décantation. La solution éthérée est évaporée dans le vide, reprise par quelques centimètres cubes d'eau et portée au bain-marie pendant quinze minutes.

Dans la solution aqueuse on identifie

L'acide lactique par la réaction de Berg et

L'acide succinique par le précipité gélatineux de succinate de fer.

En conclusion : Le vibrion cholérique récolté sur boîtes de Roux, lavé à l'eau distillée et mis en suspension pendant quatre heures à 37° en bouillon Ramon glucosé à 5 p. 1.000 à pH = 8,2, à raison de 8 à 10 mg. de corps microbiens secs par c. c. de suspension produit aux dépens du glucose :

De l'acide lactique, de l'acide succinique, de l'acide acétique, de l'acide formique, de l'alcool éthylique et des traces d'aldéhydes.

J. Hirsch en étudiant les produits de fermentation de glucose du vibrion cholérique proliférant ensemencé sur milieux synthétiques glucosés a trouvé les mêmes produits de fermentation de glucose [8].

La technique des suspensions des microbes non proliférants présente sur la technique de culture l'avantage de réaliser d'emblée une grande concentration microbienne et partant une fermentation très rapide.

En résumé :

1° La teneur maxima de glucose consommé en bouillon Ramon par des vibrions cholériques lavés, non proliférants, quelle que soit leur concentration, est de 4 à 5 g. par litre. Cette consommation s'accompagne d'une chute de pH de 8 à 5,8, qui est mortelle pour les vibrions.

2° La consommation du glucose et la chute de pH sont d'autant plus rapides que la concentration microbienne est plus élevée.

3° Pour la concentration de 2 mg. de corps microbiens par centimètre cube, on a observé un « seuil de consommation ». La consommation du glucose ne commence qu'après une heure de contact à 37°.

4° La vitesse horaire moyenne de consommation par milligramme de vibrions secs à 8 \geq pH \geq 6,1 est de 0,4 mg. environ.

5° Le taux de fermentation du glucose varie suivant le pouvoir tampon du milieu. En ajoutant 4 p. 100 d'asparagine au milieu synthétique de Kemal Moukthar, on augmente le pouvoir tampon du milieu et on élève le taux de fermentation limite de 2,2 à 4,7 par litre qui est celui réalisé en bouillon Ramon.

6° Les produits de fermentation du glucose des vibrions « non proliférants » en bouillon Ramon sont les mêmes que ceux des vibrions cultivés en milieux synthétiques glucosés.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] NOËL BERNARD (P.) et GALLUT (Jean). *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **437**, 10.
- [2] NOËL BERNARD (P.) et GALLUT (Jean). *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **437**, 11.
- [3] NOËL BERNARD (P.) et GALLUT (Jean). *Ces Annales*, 1945, **71**, 65.
- [4] RAMON (G.). *C. R. Soc. Biol.*, 1933, **412**, 8.
- [5] HAHN (Martin) et HIRSCH (Julius). *Zeitschr. f. Hygiene*, 1929, **110**, 355.
- [6] HIRSCH (J.). *Zeitschr. f. Hygiene*, 1926, **406**, 433.
- [7] PRÉVOT (A.-R.) et LOTH (R.). *Ann. Ferm.*, 1941, **6**, 76.
- [8] HIRSCH (J.). *Zeitschr. f. Hygiene*, 1929, **109**, 387.

UNE SOUCHE DE BACILLES TUBERCULEUX DE TYPE BOVIN DIFFICILE A CLASSE

par F. VAN DEINSE.

K. A. Jensen et J. Frimodt-Möller ont insisté à plusieurs reprises sur le caractère protéiforme de certaines souches de bacilles tuberculeux bovins, isolées de produits pathologiques de provenance humaine [4]. Ces souches, en effet, sont douées d'un étonnant pouvoir de dissociation, produisant de nombreuses variantes, dont l'aspect et la virulence vont de ceux d'un bacille bovin dysgonique typique jusqu'à ceux d'un bacille humain eugonique, et même du BCG. D'après ces auteurs, il serait donc prudent, quand on isole d'un crachat des bacilles de types humain et bovin, de penser à un produit de dissociation, plutôt que de se croire en présence d'une infection « mixte ». Car, s'il est vrai que les variantes qui ont perdu leur virulence pour le lapin n'ont en général plus non plus gardé intacte toute leur virulence pour le cobaye, on doit néanmoins tenir pour possible l'existence, dans la nature, de telles variantes eugoniques du bacille bovin, qui ne se laissent pas distinguer du bacille humain en ce qui concerne leur activité pathogène sur le cobaye. On observe beaucoup plus fréquemment la dissociation de la forme dysgonique vers la forme eugonique, que la dissociation en sens inverse. Chaque bacille tuberculeux, même le plus dysgonique, possèderait, d'après nos auteurs, une tendance latente au développement sous forme eugonique. Les « dissociants » eugoniques à virulence diminuée peuvent récupérer toute la virulence initiale de la souche-mère, à la suite de passages sur le lapin ou le cobaye.

Si la perte de virulence semble être surtout le fait des dissociants eugoniques, il n'est cependant pas permis de considérer l'état de la virulence comme liée à telle ou telle forme de la culture. Il existe des cultures bovines eugoniques pleinement virulentes, et nous avons nous-même eu entre les mains une culture bovine dysgonique dénuée de virulence.

Les cultures eugoniques se développent facilement et abondamment sur les milieux artificiels sous la forme de voiles secs, plissés, rugueux, et on les désigne couramment par la lettre R (« Rough »). Toutefois, certaines cultures eugoniques se présentent sous forme de colonies lisses arrondies, brillantes, de couleur crème : on les

appelle par la lettre S (« Smooth »). Les cultures dysgoniques produisent, au moment de l'isolement, de petites colonies lisses, se développant tardivement et lentement sur les milieux habituels et ne dépassant jamais la taille d'une petite tête d'épingle ; elles sont plus transparentes que les précédentes, et de couleur grise. On les désigne également par la lettre S. On a donc des cultures S eugéniques et des cultures S dysgoniques. Quand on essaie d'acclimater une culture dysgonique sur pomme de terre glycérinée, on peut la voir devenir rugueuse (R) sans qu'elle cesse d'être dysgonique : elle continue à se développer péniblement. Il est utile de préciser ici que Pétroff et ses collaborateurs [2], à qui sont dus les premiers travaux sur la dissociation du bacille tuberculeux, ont, eux aussi, isolé des « dissociants » R et S, mais que ces lettres signifiaient, chez eux, tout autre chose que l'aspect des colonies ; il s'agissait, dans leur esprit, de colonies composées de bacilles résistant ou non aux influences du milieu de culture, R signifiant « resistant », et S « sensitive ». Et, en effet, quand on examine les photographies qui accompagnent certaines de leurs publications, on s'aperçoit que leurs colonies S n'ont aucun rapport, morphologiquement, avec celles que nous avons l'habitude de voir désignées par cette lettre.

D'après Jensen et Frimodt-Möller, ces différents aspects des cultures du bacille bovin sont l'expression d'un effort d'adaptation, de la part de ces cultures, aux différents milieux, et R. Laporte [3] est du même avis.

La technique suivie par les différents auteurs pour obtenir le phénomène de dissociation, consiste en principe à étaler, sur la surface d'un milieu approprié (milieu à l'œuf de Löwenstein de préférence), en boîtes de Petri, une goutte d'une suspension très diluée de la culture en question. On repique ensuite, parmi les colonies qui se sont développées, celles qui, par leur forme, semblent être différentes du modèle courant.

Le problème de la dissociation s'est présenté à nous au cours de l'étude d'une souche de bacilles de Koch de provenance humaine, et nous l'avons abordé d'un côté différent, l'ayant rencontré au cours d'inoculations et de passages successifs chez des animaux de laboratoire. Nous nous sommes servi des notions acquises par les travaux cités, faisant autorité sur le sujet de la dissociation, pour essayer d'établir le type auquel appartient cette souche, dont nous allons maintenant décrire l'histoire.

HISTOIRE DE LA SOUCHE GUÉ.

Le 9 mars 1933 un cobaye fut inoculé sous la peau avec du sang citraté provenant d'un tuberculeux pulmonaire, et l'animal soumis à des injections bi-hebdomadaires d'extrait acétonique de bacilles

de Koch. Ayant sacrifié ce cobaye le 2 juin 1933, nous trouvâmes chez lui une tuberculose en voie de généralisation, et l'ensemencement des organes donna une culture de bacilles tuberculeux composée de colonies rugueuses, « eugoniques » (milieu à l'œuf de Löwenstein). Le 25 octobre 1933, un lapin fut inoculé par voie veineuse avec 0,001 mg. de cette culture : il mourut le 11 décembre 1933 d'une pasteurellose, sans présenter de lésions spécifiques. Un autre lapin reçut par la même voie 0,1 mg. de la culture. Sacrifié le 13 février 1934, trois mois et demi après, il présenta à l'autopsie quelques rares granulations grises sur les poumons pour toute lésion. La souche fut donc classée comme « humaine ». Elle se développait facilement et abondamment sur pomme de terre glycérinée, comme une souche humaine ordinaire, avec cette particularité qu'elle ne formait jamais aucune trace de pigment, même dans les cultures vieillies. Elle se développait facilement sur pomme de terre biliée à la bile de bœuf, alors que les souches humaines ordinaires s'adaptent en général difficilement à ce milieu. Mais nous avions déjà remarqué ces particularités chez un certain nombre de souches, isolées de cobayes, traités par des injections d'extrait acétonique, et n'y attachions pas d'importance. Or, un an plus tard, au cours de recherches sur le milieu au jaune d'œuf de Besredka, nous eûmes la surprise de constater que des cultures de notre souche Gué, ensemencées dans ce milieu, se montrèrent d'une virulence très marquée pour le lapin. La souche avait été entretenue sur pomme de terre, et n'avait subi aucun passage sur des animaux. En mai 1935, de nouvelles inoculations au lapin de la culture Gué dans le milieu de Besredka se montrèrent toujours aussi virulentes pour cet animal. Des inoculations au lapin de la même culture sur pomme de terre s'avérèrent tout aussi virulentes. Le 23 juillet 1938, 2 lapins sont inoculés par voie veineuse avec 0,001 mg. d'une culture Gué sur pomme de terre ; l'un meurt un mois plus tard, ayant des granulations caséuses sur les poumons ; l'autre est mort le 15 décembre 1938 : les poumons sont entièrement envahis par de gros foyers caséux confluents, et on trouve plusieurs granulations caséuses sur les reins. Pendant tout ce temps, la virulence pour le cobaye avait été également élevée.

Au début de 1940, la virulence pour le cobaye était toujours intacte, alors que la virulence pour le lapin commençait à diminuer : un lapin fut inoculé le 2 février 1940 par voie veineuse avec 0,01 mg. Sacrifié deux mois après, il présenta à l'autopsie des granulations caséuses pas très nombreuses sur les poumons, et aucune lésion par ailleurs. A la même date, A. Boquet a bien voulu inoculer 2 lapins avec la même dose par voie méningée. Le 16 mars, une paralysie du train postérieur commença à s'installer chez les 2. L'un mourut le 27 mars, sans lésions aux organes, l'autre le 10 avril 1940, dans un état de cachexie avancée, paralysé des

4 pattes et incontinent depuis deux semaines, ne présentant à l'autopsie aucune lésion aux organes ; l'ensemencement de la rate et du foie n'ont pas donné de cultures. A ce moment, 2 cobayes inoculés avec 0,01 mg. sous la peau moururent en deux mois et demi de tuberculose généralisée. Mais vers la fin de 1941, la virulence pour le cobaye commençait à son tour à flétrir : 1 cobaye, inoculé le 7 octobre 1941 avec 0,01 mg., est mort le 26 octobre 1943, donc plus de deux ans plus tard, d'une tuberculose généralisée à allure chronique. Enfin, en 1943, la virulence pour le lapin avait encore diminué : par exemple un lapin, inoculé par voie veineuse le 16 janvier 1943 avec 1 mg., meurt le 21 mai 1943 d'une maladie intercurrente, ayant pour toutes lésions un semis de petites granulations sur la face dorsale des poumons.

Ainsi donc, une culture de bacilles tuberculeux de provenance humaine, obtenue par le procédé des injections d'extrait acétonique de bacilles de Koch chez le cobaye, s'est montée, dans les premiers temps après son isolement, dénuée de virulence pour le lapin, tout en étant normalement virulente pour le cobaye. Après avoir été entretenue pendant plus d'un an sur pomme de terre, elle a acquis une virulence très marquée pour le lapin : puis, six ans après son isolement, cette virulence pour le lapin a commencé à diminuer, alors que la souche restait pleinement virulente pour le cobaye. La virulence pour le cobaye a commencé à diminuer à son tour au cours de la huitième année de l'existence de cette souche.

En présence de ces faits, nous avons d'abord continué à considérer cette souche comme appartenant au type humain, douée seulement d'un pouvoir pathogène exceptionnel pour le lapin. L. Nègre et J. Bretey [4], ainsi que nous-même avec J. Valtis [5], avions remarqué, en effet, que des souches isolées du cobaye par le procédé des injections d'extrait acétonique avaient souvent un certain pouvoir pathogène pour le lapin, même quand elles appartaient au type humain. Le fait que la diminution de la virulence pour le lapin, qui s'est produite en 1940, n'allait pas de pair avec une diminution de virulence pour le cobaye, semblait également plaider pour le caractère « humain » de la souche. Nous avons déjà fait remarquer plus haut, en effet, qu'une souche bovine qui perd sa virulence pour le lapin, subit en même temps une diminution de son pouvoir pathogène pour le cobaye : c'est une règle générale. Notre souche, au contraire, est restée encore pleinement virulente pour le cobaye, au moment où elle diminuait de virulence pour le lapin. Les inoculations intraméningées pratiquées par A. Boquet chez le lapin [6] plaidèrent d'ailleurs, elles aussi, pour le caractère « humain ». Il est vrai qu'elles eurent lieu à un moment où la souche était devenue moins virulente pour cet animal.

Disons, pour terminer cet aperçu, que les ensemencements,

quand ils furent pratiqués avec des organes d'animaux inoculés avec la souche Gué, ont donné des cultures R eugoniques.

Grâce aux inoculations aux animaux de laboratoire de cultures Gué biliées, nous croyons avoir réussi à déterminer avec vraisemblance le type véritable de cette souche.

Depuis plusieurs années, en effet, nous cultivons la souche Gué sur pomme de terre à la bile de bœuf, sur laquelle elle pousse facilement, comme nous l'avons déjà dit plus haut.

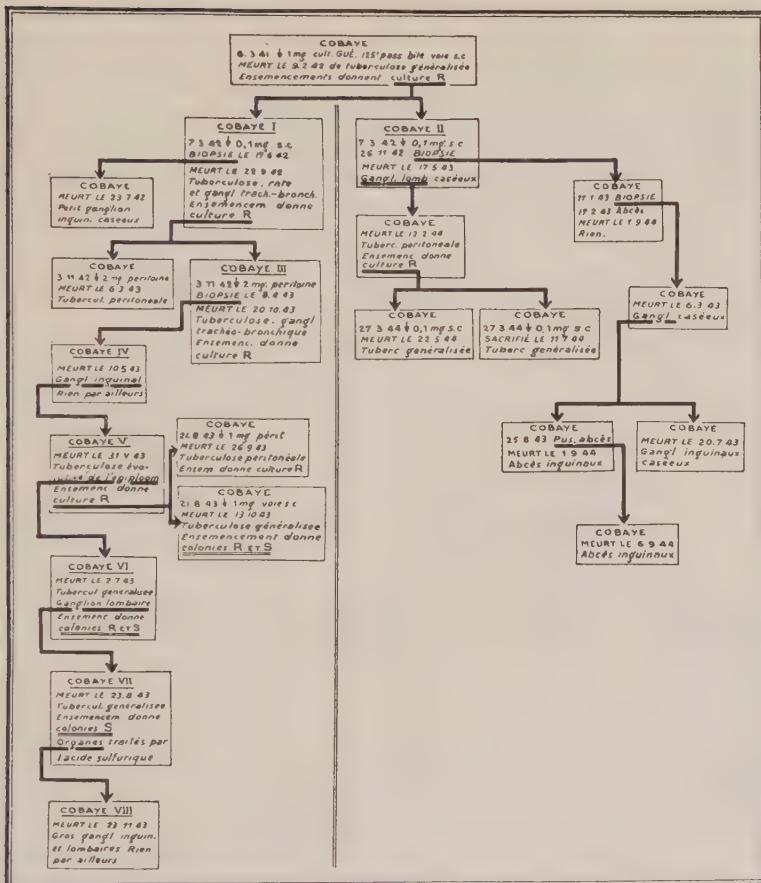
Ce fut le 125^e passage sur pomme de terre biliée qui donna les résultats d'inoculations intéressants que nous décrirons avec un peu plus de détails ; mais voici, auparavant, un bref résumé de la façon dont cette souche s'est comportée vis-à-vis des animaux de laboratoire, au cours des passages successifs sur ce milieu. Nous commençâmes les cultures sur bile au courant de l'année 1934. En octobre 1936, au 24^e passage sur bile, la souche se montra dénuée de virulence pour le lapin (0,001 et 0,1 mg. par voie veineuse) ; sa virulence pour le cobaye était atténuée. La souche-mère, entretenue sur pomme de terre ordinaire, était à ce moment pleinement virulente pour ces deux espèces animales. En juin 1938, au 64^e passage, la culture, inoculée au lapin à la dose de 1 mg. par la voie veineuse, tue cet animal par toxi-infection (Yersin, forme sans granulations [7]), alors qu'elle se montre avirulente pour le cobaye inoculé sous la peau avec la même dose. En mars 1939, au 83^e passage, elle est toujours toxique pour le lapin à la dose de 2 mg. Deux cobayes, inoculés par voie médiastinale [8] avec 1 mg. du 126^e passage en mai 1941, meurent de toxi-infection du type Yersin. En octobre 1941, une forte dose (1 mg.) du 133^e passage, inoculée par voie médiastinale à 2 cobayes, se montre moins toxique : l'un, sacrifié après un mois, n'avait que quelques grosses granulations sur les poumons, et l'autre, sacrifié après une survie de dix mois, avait pour toute lésion une ophtalmie uni-latérale [9]. Le 134^e passage fut entretenu, au cours de dix passages, sur pomme de terre ordinaire, et une forte dose de ce 134^e passage (1 mg., 10^e passage sur pomme de terre ordinaire), inoculée au début de janvier 1943 à 2 cobayes par voie cutanée, leur conféra une tuberculose généralisée à marche chronique (survies respectivement neuf et treize mois). Enfin, en octobre 1942, le 150^e passage ininterrompu sur pomme de terre biliée, inoculé à la dose de 1 mg. par voie cardiaque à un cobaye, se montra encore toxique, l'animal ayant succombé à cette inoculation en vingt-sept jours d'une toxi-infection du type Yersin ; mais un autre cobaye qui fut inoculé avec la même dose de cette culture par voie sous-cutanée mourut vingt-deux mois plus tard, ne présentant à l'autopsie qu'une adénopathie caséeuse inguinale et sous-hépatique, une seule granulation grise sur un poumon, et une petite rate bosselée et scléreuse pour toutes lésions.

Voici maintenant les faits qu'il nous a été donné de constater

au cours des inoculations du 125^e passage de la souche Gué sur pomme de terre biliée.

Le 6 mars 1941, deux cobayes furent inoculés chacun avec 1 mg. d'une culture du 125^e passage sur pomme de terre biliée par la voie sous-cutanée. L'un est mort deux mois plus tard sans autre lésion qu'un petit abcès caséux inguinal, mais l'autre mourut le 9 février 1942, donc onze mois après l'inoculation, d'une tuberculose généralisée, et de ses organes nous isolâmes une culture R eugonique. Cette culture a été le point de départ d'une série d'inoculations et de passages sur des cobayes dont on pourra suivre les grandes lignes sur le Tableau ci-joint, et que nous ne ferons que résumer brièvement ainsi : la culture R, Gué-bile-125, isolée du cobaye mort après onze mois de tuberculose généralisée, fut à son tour inoculée à deux cobayes (I et II, 0,1 mg., voie sous-cutanée). Le cobaye II ayant un gros ganglion inguinal huit mois après l'inoculation, celui-ci fut prélevé par biopsie et introduit dans l'aine chez un autre cobaye, à partir duquel 4 autres cobayes ont encore été inoculés, soit après biopsie avec des ganglions prélevés, soit avec des ganglions ou du pus prélevés après la mort : toute cette série d'animaux est restée indemne de tuberculose malgré des survies importantes (jusqu'à vingt et un mois). Quant au cobaye II lui-même, il est mort lui aussi six mois après la biopsie sans autre lésion qu'un ganglion sous-lombaire caséux, mais ce ganglion, introduit chez un cobaye neuf, a tuberculisé celui-ci, et la culture R isolée de ce dernier animal a encore tuberculisé deux autres cobayes en deux mois (0,1 mg.). En considérant cette série, que nous venons de décrire en résumé, on est frappé de voir que la culture Gué-bile-125, qui a tuberculisé le cobaye de départ, laisse tant d'animaux de passage indemnes, à quelques abcès inguinaux près, pour reprendre sa nocivité chez les animaux inoculés après la mort du cobaye II. Nous faisons remarquer que la série des cobayes restés indemnes fait suite entièrement à la biopsie pratiquée chez le cobaye II six mois avant sa mort.

Voyons maintenant l'autre série, celle qui commence au cobaye I. Cet animal, inoculé lui aussi avec 0,1 mg. de la culture Gué-bile-125 issue du cobaye mort de tuberculose généralisée, a un gros ganglion inguinal trois mois après, et ce ganglion, prélevé par biopsie, est introduit dans l'aine d'un cobaye neuf qui, succombant à une infection intercurrente un mois plus tard, n'a qu'un petit ganglion inguinal caséux pour toute lésion. Mais le cobaye I lui-même, mort trois mois après la biopsie, a une rate et des ganglions trachéo-bronchiques tuberculeux, et l'ensemencement de cette rate donne une culture R qu'on inocule à deux cobayes par voie péritonéale, dont l'un meurt quatre mois après d'une tuberculose péritonéale ; l'autre, le cobaye III, meurt



presque un an après l'inoculation, ayant pour toutes lésions un abcès inguinal et un paquet de ganglions trachéo-bronchiques casseux, dont nous isolons une culture R, virulente pour le cobaye, mais avirulente pour le lapin. Cinq mois après l'inoculation, le cobaye III avait présenté un ganglion inguinal dur qui, après biopsie, fut introduit dans l'aine chez un cobaye neuf. Et c'est ici que commence la série qui, par les phénomènes de dissociation qu'elle a produits, nous a semblé légitimer la publication de ces expériences.

Ce cobaye neuf, chez lequel nous avons introduit le ganglion inguinal du cobaye III, obtenu par biopsie (nous appellerons ce cobaye neuf le cobaye IV), est mort un mois après sans autre lésion qu'un ganglion inguinal droit tuméfié, non casseux. Ce ganglion, broyé et traité par l'acide sulfurique, fut inoculé par

voie péritonéale chez un cobaye (V), qui mourut trois semaines plus tard d'une tuberculose de l'épiploon. Un fragment de cet épiploon fut introduit par biopsie dans l'aïne d'un cobaye (VI), mort un mois plus tard d'une tuberculose généralisée. Un ganglion tuberculeux de ce dernier cobaye fut introduit par biopsie dans l'aïne d'un cobaye (VII), qui succomba à son tour, en moins de deux mois, d'une tuberculose généralisée. Les organes de ce cobaye VII, broyés et traités par l'acide sulfurique, furent inoculés au cobaye VIII, par voie sous-cutanée, et ce dernier animal mourut trois mois plus tard, ayant pour toute lésion spécifique un gros ganglion non caséux au point inoculé et un autre dans la région sous-lombaire.

Or, les ensemencements sur milieu à l'œuf de Löwenstein des organes du cobaye V nous ont donné des colonies R, qui ont tuberculisé deux cobayes, dont l'un nous a donné, à l'ensemencement, des cultures composées d'un semis de toutes petites colonies S dysgoniques et quelques colonies R eugoniques.

L'ensemencement des organes du cobaye VI a produit d'emblée des cultures dissociées composées de fines colonies S dysgoniques et de colonies R eugoniques.

Les ensemencements des organes du cobaye VII, également après traitement par l'acide sulfurique, ont produit des cultures composées exclusivement de colonies S.

Les ensemencements des organes du cobaye VIII sont restés stériles.

Nous avons pratiqué des inoculations au cobaye et au lapin avec les variantes S et R ainsi obtenues. Les cultures S se sont toutes comportées de la même façon : elles sont très virulentes pour le lapin et le cobaye, et ne se distinguent pas de cultures bovines typiques. Elles ont une tendance prononcée à produire, sur Löwenstein, des colonies R eugoniques qui, au début de leur isolement tout au moins, possèdent la même virulence pour le cobaye et le lapin. Pour conserver à cette variante son caractère S, nous sommes obligé de l'entretenir sur milieu de Laporte à l'œuf-sérum.

Les cultures R eugoniques, obtenues par l'ensemencement des organes du cobaye VI (cultures dissociées), sont beaucoup moins virulentes que les colonies S : deux cobayes furent inoculés sous la peau avec 1 mg. de cette culture R ; l'un est mort après huit mois sans aucune lésion tuberculeuse, et les ensemencements de ses organes sont restés stériles ; l'autre a succombé un an après l'inoculation, ayant une tuberculose de la rate. Deux lapins reçurent dans les veines chacun 0,1 mg. de la même culture R : l'un est mort en un mois d'une granulie intense des poumons, ayant en outre quelques foyers caséux sur la rate et quelques granulations grises sur les reins ; les ensemencements n'ont donné

que des colonies R. L'autre lapin est mort seize jours après l'inoculation d'une coccidiose, sans présenter à l'autopsie la moindre lésion tuberculeuse, mais les ensemencements de ses poumons et de la rate ont donné des colonies S exclusivement (?).

Ainsi, une souche eugonique de bacilles tuberculeux poussant sous forme de colonies R, de provenance humaine, considérée longtemps comme appartenant au type humain, malgré une virulence prononcée pour le lapin, qui s'y était développée spontanément après quelques passages sur pomme de terre, s'est atténuée à la longue au cours de passages successifs sur pomme de terre glycérinée ordinaire et surtout sur pomme de terre biliée. Toutefois, à la suite d'un certain nombre de passages de cobaye à cobaye, la culture du 125^e passage sur bile a repris une virulence très élevée pour le cobaye et le lapin, mais sous la forme d'un « dissociant » « S », dysgonique au début, se comportant à tous les points de vue comme une culture de type bovin.

La première objection qui vient à l'esprit, quand on parcourt la description et le tableau que nous venons de donner, est celle d'une infection spontanée, qui se serait surajoutée à l'infection expérimentale, au cours des passages de cobaye à cobaye. On sait que de telles contaminations sont toujours à craindre au cours de passages d'animal à animal. Nous-même avons eu d'abord le réflexe d'écartier ces observations de nos dossiers. Mais d'abord, la souche Gué-bile-125 n'était pas entièrement avirulente : le cobaye qui figure en tête du tableau est mort lui-même de tuberculose généralisée. La culture isolée du cobaye V, qui se présente sous la forme R, pure, sans mélange avec des colonies « S », s'est montrée virulente pour deux cobayes neufs, alors que dans les cultures isolées de ces derniers, il y a eu dissociation de colonies « S » pour l'un des deux seulement. On a l'impression d'être en présence, non d'un mélange de bacilles R atténus et de bacilles S virulents provenant d'une contamination, mais d'un bacille R redevenu pleinement virulent, et en puissance de dissocier des colonies S. Cette tendance à la dissociation semble devenir de plus en plus forte au cours des passages, puisque le cobaye VI a donné à l'ensemencement des cultures dissociées d'emblée en colonies R et S, et que le cobaye VII n'a plus donné que des colonies S uniquement. Ce n'est d'ailleurs pas la première fois que nous assistons à ce phénomène de dissociation chez une souche biliée. Nous eûmes l'occasion d'en mentionner un autre cas en passant, dans notre mémoire sur les cultures bovines biliées, paru dans ces *Annales*, 1941, 66, 6 : l'ensemencement d'organes d'un lapin mort à la suite de l'inoculation d'une culture de bacilles bovins biliés 29^e passage) a permis d'isoler une culture dissociée en colonies R et S, dont les « R » étaient totalement avirulentes pour le cobaye et le lapin, les « S » possédaient une virulence atténuée pour ces deux espèces animales.

L'argument le plus péremptoire contre l'existence, dans cette série de passages, d'un bacille surajouté par une infection spontanée, est cependant donné par le cobaye VIII. Cet animal, qui a été inoculé avec le produit de broyage d'organes provenant du cobaye VII (mort de tuberculose généralisée), traités par de l'acide sulfurique à 15 p. 100 selon la méthode habituelle, est mort, trois mois plus tard, d'une maladie intercurrente, sans présenter d'autres lésions qu'un gros ganglion non caséux inguinal et lombaire. Il est évident que si nous nous étions trouvé en présence d'une infection mixte ordinaire, le cobaye VIII aurait dû mourir d'une tuberculose rapidement évolutive comme son prédecesseur.

Nous croyons donc pouvoir considérer l'apparition de colonies S typiquement bovines comme un retour à la virulence originelle de notre souche, et nous y voyons une indication, que la souche Gué, que nous avons tenue si longtemps pour une humaine, appartient en réalité au type bovin. La culture R virulente, isolée du cobaye V, aurait alors été composée de bacilles peu virulents, qui se sont maintenus sous la forme de colonies R, et de bacilles virulents, ayant une tendance à la dissociation vers la forme S. Au moment du passage du cobaye VII au cobaye VIII, ces bacilles virulents S seraient, pour une raison qui nous échappe, revenus en arrière, et auraient redonné des bacilles de faible virulence. Malheureusement, les ensemenagements des organes de ce dernier cobaye n'ont pas donné de cultures, et il nous a donc été impossible d'en déterminer la forme de colonies.

Nous continuons l'étude de cette souche intéressante et de ses variantes ; mais il nous semble possible de faire dès aujourd'hui le point de ces recherches, puisqu'elles nous ont déjà donné une indication précieuse concernant le type auquel appartient la souche Gué. Nous avons déjà mentionné plus haut la variabilité extraordinaire des souches bovines de provenance humaine, telle que Jensen et Frimodt-Möller l'ont exposée dans les travaux décrivant leurs longues et minutieuses recherches. Ces auteurs ont vu notamment, comme nous l'avons dit, que des « dissociants » à virulence atténuée peuvent récupérer toute la virulence initiale de la souche bovine à la suite de passages sur le lapin ou le cobaye. Les souches de bacilles tuberculeux qu'on entretient sur pomme de terre biliée, et qui, de ce fait, perdent une partie de leur virulence, peuvent être considérées comme des souches « mutilées », pour employer un terme de Van Loghem [10]. Elles gardent leur génotype intact. Un retour à la virulence serait donc un exemple d'« atavisme » dans le sens que Beyerinck [11] a donné à ce terme, pour expliquer la réapparition, chez certaines souches microbiennes entretenues au laboratoire, de propriétés qu'elles semblaient avoir perdues depuis longtemps. De tels cas de réapparition d'une propriété perdue par mutilation, désignés à tort comme « plus-

mutants », sont rares en bactériologie. Il est probable qu'avec le nombre de passages sur bile, l'atténuation d'une souche de bacilles tuberculeux augmente et une réapparition de la virulence devient de plus en plus problématique. Que cette « mutilation » de la souche ait lieu par élimination progressive d'éléments virulents, comme le pensent Jensen et Frimodt-Möller, ou d'une autre manière qui nous échappe encore, la chance d'un retour à la virulence normale s'approche finalement de zéro.

L'étude des passages de cobaye à cobaye du 125^e passage de notre souche Gué nous a fait voir la grande variabilité de la virulence de cette culture. Si certains animaux résistent parfaitement à l'infection, alors que d'autres deviennent tuberculeux après des délais variables, nous croyons que ces différences ne sont pas dues seulement à des degrés variés de virulence, mais également à la résistance individuelle des cobayes vis-à-vis de l'infection tuberculeuse. La survie et la présence ou l'étendue des lésions spécifiques peuvent alors être considérées comme la résultante des deux facteurs en jeu : virulence plus ou moins atténuée et résistance plus ou moins prononcée.

Enfin, un dernier fait mérite notre attention : plusieurs fois, au cours de ces passages de cobaye à cobaye, des ganglions inguinaux ont été prélevés par biopsie et inoculés, également opérativement, à des cobayes neufs. Nous avons été frappé par l'absence de lésions tuberculeuses évolutives chez les animaux de passage, dont le premier fut inoculé avec le ganglion prélevé *par biopsie* au cobaye II, alors que le cobaye inoculé avec un ganglion lombaire caséux de ce même cobaye II, prélevé *après la mort* de celui-ci, est devenu tuberculeux, de même que les deux cobayes infectés avec la culture R isolée de ce dernier (voir le Tableau). Les biopsies pratiquées chez les cobayes I et III ont donné des résultats moins probants, car les animaux de passage n'ont pas survécu assez longtemps. Mais nous avons une observation tout à fait curieuse, obtenue avec le 134^e passage sur pomme de terre biliée de cette même souche Gué, et tout à fait comparable à celle du cobaye II. Nous comptons décrire ces observations *in extenso* dans une note à part.

RÉSUMÉ.

Une souche de bacilles tuberculeux, de provenance humaine, douée d'une virulence marquée pour le lapin, a été considérée, pour des raisons que nous avons exposées, comme appartenant au type humain. Des passages successifs sur pomme de terre biliée ayant amené une diminution assez notable de la virulence de cette souche, nous avons pratiqué un certain nombre d'inoculations de cobaye à cobaye, en partant du 125^e passage sur bile. Au cours de ces inoculations en série, nous avons assisté à un

retour à la virulence de notre culture, sous la forme de colonies « S » dysgoniques, ayant tous les caractères du type bovin. Nous en concluons que la souche originelle appartenait en réalité au type bovin.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] JENSEN (K. A.) et FRIMODT-MÖLLER (J.). *Acta Tuberc. Scand.*, **8**, fasc. 3 ; *Acta Tuberc. Scand.*, 1936, **10**, 217. — JENSEN (K. A.), FRIMODT-MÖLLER (J.) et KIAER (I.). *Acta Tuberc. Scand.*, **11**, fasc. 3-4. — FRIMODT-MÖLLER (J.). *Acta Tuberc. Scand.*, supplément, 1939. — JENSEN (K. A.) et LESTER (VÉRA). *Acta Tuberc. Scand.*, 1941, **15**, 15.
- [2] PETROFF (S. A.), BRANCH (A.) et STEENKEN (W.). *Am. Rev. Tub.*, 1929, **49**, 9.
- [3] LAPORTE (R.). Ces *Annales*, 1936, **57**, 400.
- [4] NÈGRE (L.) et BRETEY (J.). Ces *Annales*, 1935, **55**, 273.
- [5] VALTIS (J.) et DEINSE (F. VAN). *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **120**, 743.
- [6] BOQUET (A.). Ces *Annales*, 1938, **61**, 479.
- [7] DEINSE (F. VAN). Ces *Annales*, 1941, **66**, 191.
- [8] DEINSE (F. VAN). Ces *Annales*, 1943, **69**, 1.
- [9] BABLET (J.) et DEINSE (F. VAN). Ces *Annales*, 1943, **69**, 45.
- [10] LOGHEM (J. J. VAN). *Zeitschr. Hyg. u. Infekt. Kr.*, 1929, **110**, 382.
- [11] *Folia Microbiol.*, 1912, 1, cité par LOGHEM (VAN), L. c.

RECHERCHES SUR LA CHIMIOTHÉRAPIE ASSOCIÉE A LA DÉSENSIBILISATION EN TUBERCULOSE EXPÉRIMENTALE

par B. KREIS (*).

Le nouvel essor que la chimiothérapie connaît depuis quelques années a réveillé l'espoir, si longtemps considéré comme chimérique, de la guérison de la tuberculose par une médication chimique. Entretenant des recherches en ce sens et ne disposant que de produits de faible activité, nous avons pensé que le problème était régi aussi par des conditions biologiques. Le traitement antisyphilitique n'a pas une efficacité aussi complète chez un malade atteint d'accidents tertiaires que chez un sujet porteur d'un chancre. Au cours de la sulfamidothérapie, R. Legroux a bien montré que les différences d'action observées dans les diverses infections ne tennent pas tant à la résistance propre du *microbe* qu'aux caractères particuliers de la *lésion* qu'il engendre (1). La chimiothérapie ne se montre pas active à toute heure ; elle s'adresse à des maladies qui évoluent et des organismes qui réagissent.

Or, l'affection tuberculeuse se singularise par les modalités des réponses qu'elle provoque : barrière cellulaire, nécrose caséuse, thromboses vasculaires empêchant le médicament d'entrer en contact avec le germe. Nous avons supposé que l'allergie tuberculeuse était responsable de l'intensité de ces réactions et constituait ainsi un obstacle fondamental à toute chimiothérapie antituberculeuse. Nous avons pensé que l'extinction de la sensibilité tuberculeuse, sans nuire à la défense de l'organisme, ou même en la facilitant, pouvait donner son plein effet à des substances faiblement actives dans les conditions habituelles.

Il est ici nécessaire d'ouvrir une parenthèse. Notre hypothèse est en contradiction avec les idées classiques qui voient dans l'allergie le mécanisme explicite ou tout au moins un support de l'immunité tuberculeuse. La réaction inflammatoire locale, avec son œdème et son afflux cellulaire n'expliquent-ils pas le phénomène de Koch, le refus des germes de surinfection par l'organisme tuberculisé, la barrière qu'il oppose à la dispersion et à la multiplication des bacilles ? Mais l'inter-

(*) Société française de Microbiologie, séance du 2 novembre 1944.

(1) R. LEGROUX. *C. R. Acad. Chir.*, 1941, 67, 352.

prétation de ces phénomènes mérite peut-être d'être révisée à la lumière des données de la microbiologie générale. Bien suggestif à cet égard est le travail que Rich et ses collaborateurs (2) ont consacré à l'allergie pneumococcique. Vaccinés et rendus allergiques au pneumocoque, les lapins réagissent à une infection d'épreuve par une forte réaction locale avec fixation *in situ* des germes, puis guérissent ; les témoins font au contraire une septicémie. Mais les lapins vaccinés puis désensibilisés ne présentent plus aucun phénomène inflammatoire local après l'infection d'épreuve ; et cependant les germes restent aussi bien agglomérés au point d'inoculation et les animaux guérissent. L'inflammation, l'œdème, la réaction leucocytaire ne jouent donc pas un rôle nécessaire. Semblable démonstration a été donnée par Birkhaug (3) pour le bacille tuberculeux. Chez des cobayes tuberculeux allergiques, les bacilles de surinfection injectés dans les ganglions y restent bloqués cinq semaines avant de diffuser, alors que chez l'animal neuf, ils se disséminent en moins de trois jours ; mais si l'on désensibilise par la tuberculine les cobayes allergiques, les bacilles restent plus longtemps encore immobilisés dans le ganglion, essaient encore plus lentement, et les lésions provoquées sont même bien moindres que chez les cobayes laissés allergiques. L'absence de dispersion des germes de surinfection chez l'animal tuberculeux ne relève donc pas d'une réaction allergique locale. Résumant récemment l'ensemble de ses importantes recherches, A. Boquet conclut que l'hypersensibilité à la tuberculine et l'immunité antituberculeuse n'ont que des relations accessoires. (*Bull. Acad. Méd.*, 1945, **109**, 430).

Certains auteurs ont même soutenu que l'allergie, loin de représenter toujours un facteur d'immunité, avait une action nocive dans l'évolution de la maladie ; la violence de la nécrose et de la caséification est une cause de destruction tissulaire, l'intensité de l'afflux leucocytaire favorise la dissémination microbienne. De fait, plusieurs expérimentateurs en ces dernières années ont montré que si l'on désensibilise les animaux aussi complètement que possible, l'évolution de la tuberculose expérimentale non seulement n'en était pas aggravée, mais au contraire ralentie. Citons seulement l'importante expérience de Rothschild, Friedenwald et Bernstein (4) portant sur près de 600 cobayes, les uns vaccinés, les autres vaccinés et désensibilisés ; le travail analogue de Wilson, Schwabacher et Maier (5) ; les résultats de Derick, Branch et Crane, montrant plus simplement que les animaux infectés et désensibilisés survivent plus longtemps que les témoins ; la longue série de recherches par laquelle Birkhaug (6) apporte à ces vues une démonstration remarquablement rigoureuse. La clinique nous confirme d'ailleurs que, chez l'homme, l'affaiblissement de l'allergie au cours

(2) A. R. RICH, F. B. JENNINGS et L. M. DOWNING. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1933, **53**, 172.

(3) K. BIRKHAUG. *Acta Tuberc. Scand.*, 1937, **11**, 25 ; voir aussi **11**, 199 ; *ibid.*, 1939, **13**, 163-221 ; *Acta med. Scand.*, 1941, **109**, 250 ; 1942, **112**, 293.

(4) H. ROTSHILD, J. S. FRIEDENWALD et C. BERNSTEIN. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1934, **54**, 232.

(5) WILSON, SCHABACKER et MAIER. *J. Path. a. Bact.*, 1940, **50**, 98.

(6) K. BIRKHAUG. *Loc. cit.*

d'un traitement tuberculinique n'entraîne pas, loin de là, une diminution des défenses organiques.

Nous étions donc fondés à tenter d'associer la désensibilisation à la chimiothérapie. Le choix de l'agent désensibilisant était assez restreint, les tuberculines, les extraits ou les émulsions bacillaires étant les seuls produits connus montrant une activité de cet ordre sur l'allergie tuberculeuse. L'utilisation de la tuberculine n'est cependant pas sans inconvénients ; il est nécessaire d'en faire absorber aux animaux une dose importante, dont l'action toxique propre est à considérer ; par ailleurs, en cas de désensibilisation incomplète, chaque injection peut être génératrice de réactions focales gênantes. Des considérations théoriques et quelques résultats expérimentaux tendant à attribuer à l'histamine un rôle de premier plan dans les manifestations de l'allergie tuberculeuse, nous avons étudié, dans des essais préliminaires, l'action antiallergique possible d'un antihistaminique de synthèse le 2339 R.P. ou antergan. Ces recherches préalables, assez étendues pour justifier un développement à part, et portant sur une quarantaine de cobayes, nous ont montré que ni les manifestations cutanées, ni les réactions thermiques, ni le choc tuberculinique mortel n'étaient suffisamment influencés par ce corps. Force nous a donc été d'en rester à la tuberculine ; nous avons adopté avec Birkhaug, la dose de 1/10 de centimètre cube de tuberculine brute tri-hebdomadaire par cobaye, suffisante pour assurer une désensibilisation effective, et bien tolérée par les animaux.

Nous nous sommes adressés, comme produit chimiothérapeutique, au paraaminophénylsulfamide sous sa forme commerciale de septoplrix. On sait en effet que l'action bactériostatique de ce corps est générale pour les microbes. Son activité sur les cultures du bacille de Koch a été vérifiée par d'assez nombreux travaux, en France en particulier par Courmont (7), N. Rist (8), Arloing, Thévenot et Viallier (9). Au cours de la tuberculose expérimentale Rich et Follis, en 1938, ont observé des résultats encourageants (10) tantôt confirmés (Buttle et Parisch (11) ; Grey, Campbell et Culley ; Ballon et Guernon (13) ; N. Rist, Bloch et Hamon (14) ;

(7) P. COURMONT, A. MOREL et M^{me} PERIER. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **129**, 663.

(8) N. RIST. *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **130**, 972.

(9) ARLOING, THÉVENOT et VIALLIER. *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **135**, 1.624.

(10) RICH et FOLLIS. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1938, **62**, 77 et 1939, **65**, 466.

(11) BUTTLE et PARISCH. *Brit. Med. J.*, 1938, 776.

(12) GREY, CAMPBELL et CULLEY. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1938, **39**, 22.

(13) BALLON et GUERNON. *J. Thor. Surgery*, 1938, **8**, 184.

(14) N. RIST, BLOCH et HAMON. *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **130**, 976.

Nitti (15) ; Corper, Cohn et Bower (16), tantôt complètement infirmés [Smithburn (17) ; Kolmer, Raiziss et Ruel (18), Nils Levin (19)] ; c'est dire que ce corps ne possède sur les bacilles tuberculeux dans les conditions habituelles qu'une activité médiocre, qui le rendait particulièrement adapté à notre hypothèse de travail. Nous n'avons pas voulu recourir, pour l'administrer, à la voie buccale, trop imprécise ; les doses utilisées se sont donc trouvées fixées par la limite de solubilité de ce composé. D'autre part, la nécessité du maintien continu d'un taux suffisant du produit en circulation nous a contraint à pratiquer deux injections quotidiennes.

DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL. — L'expérience devait être réglée de façon à vérifier :

1^o La possibilité d'une désensibilisation par la tuberculine au cours de la tuberculose expérimentale du cobaye et son action sur l'évolution de la maladie ;

2^o Le rôle thérapeutique du septoplix seul ;

3^o Les résultats de l'action conjuguée des deux produits.

Notre expérience a porté sur 24 jeunes cobayes de 300 à 500 g., du même élevage, divisés en quatre groupes aussi homogènes que possible. Tous ces animaux ont été infectés, le 23 septembre 1943, sous la peau de la cuisse gauche, avec 0,001 mg. (pesés humides) d'une culture de bacilles tuberculeux (bacilles humains souche Bar..., isolée par nous d'un liquide pleural de pneumothorax thérapeutique). Il nous a paru essentiel de réaliser une infection susceptible de donner des lésions manifestes, facilement comparables, et une allergie rapide ; infection assez faible toutefois pour permettre une large survie aux animaux et ne pas déborder les possibilités de la thérapeutique.

A partir du jour de l'inoculation les animaux du groupe I et III, ont reçu régulièrement, matin et soir, sans un seul jour d'arrêt, sous la peau du ventre, chacun une injection de 5 c. c. de solution saturée tiède de septoplix correspondant à 0,08 de produit par jour.

De même les animaux du groupe I et II, ont reçu, les lundi, mercredi et vendredi de chaque semaine, une injection de 0,1 c. c. de tuberculine brute (tuberculine de l'Institut Pasteur à usage vétérinaire) alternativement sous la peau de la patte droite, du flanc et du thorax. Ces injections ont été commencées huit jours avant l'inoculation.

Les cobayes du groupe I bénéficiaient donc de l'association tuberculine sulfamide ; les animaux du groupe II de la tuberculine seule ; ceux du groupe III, du sulfamide seul ; le groupe IV servait de témoin.

(15) NITTI et JOUIN. *Ces Annales*, 1942, **68**, 536.

(16) H. S. CORPER, M. L. COHN et C. BOWER. *Am. Rev. Tub.*, 1939 **40**, 452.

(17) SMITH BURN. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. med.*, 1938, **38**, 574.

(18) KOLMER, RAİZISS et RUEL. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. med.*, 1938, **39**, 581.

(19) NILS LEVIN. *Acta Med. Scand.*, 1938, **98**, 422.

Poids des organes de chaque groupe de 6 cobayes.

NOMBRE DES COBAYES	DURÉE de l'expérience en jours	POIDS DE L'ANIMAL		POIDS DE LA RATE en grammes	POIDS DES GANGLIONS en grammes	POIDS DES POUmons en grammes	POIDS DU FOIE en grammes
		Au début de l'expérience	A la fin de l'expérience				
<i>I. — Cobayes sulfamide-tuberculine.</i>							
1777	140	370	385	0,600	0,720	3,600	13,100
1778	154	380	525	1,350	1,440	6,450	19,200
1779	142	290	380	1,210	0,945	8,750	17,800
1780	153	450	545	0,900	1,990	6,630	27,570
1781	138	300	350	1,450	0,400	3,550	14,300
1782	153	335	385	0,425	0,660	3,500	12,500
		2.125	2.570	5,935	6.125	32,480	104,470
<i>II. — Cobayes tuberculine.</i>							
1783	149	410	530	1,680	1,860	8,460	25,750
1784	152	305	440	0,600	1,030	3,780	19,180
1785	139	300	395	0,800	2,010	8,320	18,800
1786	148	350	425	1,580	2,410	9,950	27,800
1787	142	315	445	0,700	1,500	5,400	22,800
1788	140	310	405	2,360	1,860	13,150	23,400
		1.990	2.640	7,720	10,670	49,060	137,730
<i>III. — Cobayes sulfamide.</i>							
1789	146	405	445	3,300	4,740	5,650	26,660
1790	138	340	255	1,450	2,200	3,000	13,750
1791	147	355	325	2,600	1,045	7,000	21,650
1792	141	415	500	1,330	1,935	6,400	29,500
1793	152	370	435	0,880	2,740	4,000	21,150
1794	86 *	340	275	0,745	0,665	6,950	12,860
		2.225	2.235	10,305	12,325	33,000	125,570
<i>IV. — Cobayes témoins.</i>							
1795	148	395	495	8,870	3,620	11,950	38,700
1796	143	495	605	2,600	6,400	8,250	37,000
1797	100 *	315	255	7,850	3,030	7,700	22,000
1798	149	405	535	2,410	9,235	6,800	25,080
1799	116 *	360	285	9,400	1,190	5,370	28,300
1800	140	370	495	2,730	4,560	7,020	31,250
		2.340	2.670	33,860	28,635	47,090	182,330

* Mort spontanée.

DURÉE DE L'EXPÉRIENCE. — On peut chercher à apprécier la valeur d'une thérapeutique de la tuberculose d'après les délais de survie des animaux traités et des témoins. Cette méthode simple est grevée de nombreux reproches (lenteur des délais et infections intercurrentes — difficultés d'une comparaison valable des lésions — mortalité considérée comme démontrant une extension plus grande de l'affection alors qu'elle traduit seulement une localisation prédominante sur le foie ou le poumon). Elle perdait toute signification, dans notre cas, du fait de l'importance des dégâts locaux occasionnés par la répétition de volumineuses injections et de l'action toxique possible des produits injectés. Le seul test rigoureux était la comparaison exacte des lésions après une même durée, assez longue, d'évolution. Aussi après la mort de 2 de nos témoins au centième et au cent-seizième jour, avons-nous sacrifié le restant de nos animaux entre le cent-trente-huitième et le cent-cinquante-troisième jour.

Au cours de ces mois d'expérience, malgré la saison hivernale et plus de 4.000 injections, un seul de nos cobayes est mort de maladie intercurrente, au quatre-vingt-sixième jour. Les courbes de poids se sont montrées dans l'ensemble ascendantes ; ceci témoigne des conditions très favorables de notre élevage. Les témoins n'ont fait l'objet d'aucune remarque particulière ; ils ont présenté, comme les animaux des autres groupes, des chancres d'inoculation qui ont suppuré plus ou moins longtemps avant de se refermer. Les animaux injectés de tuberculine seule, n'ont pas paru affectés par ce traitement. Ceux qu'on traitait par le sulfamide offraient un aspect assez lamentable, une véritable carapace fibreuse rétractant leur abdomen et rendant très difficile de préciser si l'injection était toujours sous-cutanée ou parfois intrapéritonéale ; quelques nécroses cutanées ont même été observées. La dose totale de tuberculine s'est élevée, pour toute la durée de l'expérience, à 6,3 c. c. ou 6,6 c. c. de tuberculine brute ; celle de sulfamide a atteint 11,04 g. à 12 g. On ne saurait évidemment rapporter ces chiffres au seul poids global de l'animal et considérer qu'ils correspondent, chez l'homme de 60 kg., à 1 litre de tuberculine et à 1,800 kg. de sulfamide.

Les *dosages de sulfamide*, pratiqués à l'autopsie de nos animaux, ont montré que, dans les conditions de l'expérience, le produit n'était pas accumulé dans les organes et s'éliminait très rapidement ; vingt minutes après la dernière injection de 0,04 g. de septoplrix, on en trouvait (en milligramme par gramme d'organe) : 0,30 à 0,15 dans le foie ; 0,10 à 0,20 dans le poumon ; 0,10 à 0,08 dans la rate et les ganglions. Six heures après la dernière injection les quantités étaient inférieures au 1/10 de milligramme ; elles diminuaient encore entre le 1/10 et le 1/100 de milligramme, après douze et seize heures ; elles étaient inférieures au 1/100 de milligramme ou indosables après vingt-quatre heures. Nous n'avons pas trouvé de différences appréciables dans la teneur des organes en sulfamide entre le groupe I et le groupe III.

RÉACTIONS A LA TUBERCULINE. — Des intradermo-réactions ont été pratiquées, deux fois par mois, puis une fois par mois, avec des seringues spéciales donnant de façon précise le 1/10 de centimètre cube, et exactement mesurées. Elles se sont montrées particulièrement intenses chez les témoins. Avec la tuberculine au 1/10 elles étaient déjà légèrement

nécrotiques au quinzième jour ; plus fortement au trentième. A partir de ce moment, et pour éviter de trop volumineuses escarres nous n'avons plus employé que la solution de tuberculine au 1/100 pour les groupes III et IV, tout en continuant à nous servir de tuberculine au 1/10 pour les groupes I et II, désensibilisés. L'allergie des témoins est restée sensiblement égale à elle-même jusqu'à la fin de l'expérience. Il est à noter que les cobayes sulfamidés ont tous présenté des réactions moins intenses que les témoins ; ce fait ne doit pas être rapporté à la moindre extension des lésions ; il traduit peut-être l'action du médicament sur le système réticulo-endothélial. Quant aux cobayes désensibilisés, le groupe II n'a présenté que des réactions très légères, transitoires, jamais nécrotiques, difficiles à différencier des réponses érythémateuses qu'on obtient chez les cobayes sains à peau blanche ; le groupe I, des réactions encore plus franchement négatives. Nous avons pu vérifier sur d'autres cobayes soumis au même mode de désensibilisation que la perte de la sensibilité cutanée s'accompagne dans ces conditions, de la disparition des réactions thermiques aux injections et de l'absence de choc mortel aux doses létale de tuberculine. La désensibilisation de nos animaux peut donc être considérée, sinon comme totale, du moins comme suffisante.

CONSTATATIONS ANATOMIQUES. — C'est sur les protocoles d'autopsie que devait se juger l'expérience. Les résultats en ont été les suivants : malgré notre thérapeutique précoce et continue tous les animaux sont devenus tuberculeux ; bien plus, dans chaque groupe, on a observé chez l'un ou l'autre animal des lésions de la rate, du foie ou des poumons aussi importantes que chez tel animal d'un autre groupe. Nous n'apportons donc pas, et personne n'a apporté jusqu'ici, le traitement de la tuberculose expérimentale du cobaye, affection toujours mortelle quels que soient la dose inoculée, l'âge, le poids de l'animal. Toutefois, si l'on ne se réfère pas à un animal isolé, mais à la somme des lésions observées dans chaque groupe, telle qu'elle est figurée sur nos schémas, on ne peut manquer d'être frappé des différences observées.

La *rate* est l'organe capital à considérer, car son volume constitue un véritable réactif du degré de tuberculisation. *Le poids moyen de la rate a été de : 0,989 g., dans le groupe I ; 1,286 g., dans le groupe II ; 1,717 g., dans le groupe III ; 5,643 g., dans le groupe témoin.* (Nous n'avons pas cru devoir rapporter le poids des organes aux poids des animaux, ceux-ci étant très voisins. Les rapports diffèrent d'ailleurs selon qu'on envisage le poids initial, le poids terminal, le poids maximum ou un poids moyen fictif).

Un élément très important réside dans le degré de l'atteinte *ganglionnaire* locale et générale. Les poids moyens des ganglions inguino-cruraux ont été respectivement de : 0,547, 1,003, 1,282, 2,078 ; ceux des ganglions aortiques : 0,1134, 0,235, 0,308, 0,786 ; ceux des ganglions mésentériques : 0,020, 0,025, 0,071, 0,395 ; ceux des ganglions trachéobronchiques : 0,151, 0,221, 0,187, 1,286 ; ceux des ganglions axillaires : 0,070, 0,108, 0,095, 0,096 ; ceux des ganglions cervicaux : 0,098, 0,185, 0,109, 0,128 ; *ceux des ganglions totaux : 1,02, 1,77, 2,05, 4,77.* Il faut signaler les causes d'incertitude dans l'évaluation du poids des ganglions inguino-cruraux que représentent leur caséification totale

(un poids minimum a été déterminé et ajouté au total) et surtout leur évacuation possible à l'extérieur. La précocité de l'atteinte ganglionnaire locale sur laquelle insistent Bruno Lange et Lydtin (20) ne nous a pas paru varier dans les différents groupes.

Pour les organes lourds comme le foie et le poumon, les différences de poids donnent peut-être une idée moins fidèle de l'importance des lésions que pour la rate ou les ganglions. La quantité de sang présente dans les organes, des différences constitutionnelles, peuvent intervenir de façon appréciable ; les poids élevés correspondent cependant toujours à des organes très lésés. Les poids moyens ont été respectivement :

Pour le foie	18,78	22,955	20,928	30,388
Pour le poumon . .	5,413	8,416	5,6	7,848

On notera l'atteinte pulmonaire notable des cobayes traités par la tuberculine seule, fait déjà signalé par plusieurs auteurs. Quant au poids du foie, la comparaison entre les groupes II et III est faussée par la mort prématurée d'un cobaye de ce dernier groupe ; si on l'élimine de la statistique, le poids moyen du foie du groupe III devient : 22,542.

On peut rechercher une comparaison plus exacte des différents groupes en considérant non pas la moyenne globale, trop influencée par les cas aberrants, mais le cobaye médian théorique obtenu en prenant, pour chaque organe, le poids situé à égale distance des extrêmes (21). On obtient ainsi les chiffres suivants pour chaque groupe :

Rate.	1,055	1,190	1,385	5,290
Ganglions.	0,833	1,880	2,067	4,090
Foie.	16,050	23,100	21,400	29,775
Poumons	5,025	8,380	6,025	7,360

qui ne modifient guère l'aspect de l'expérience.

On définit souvent le degré de tuberculisation d'un animal par la simple *recherche macroscopique des granulations* à la surface des viscères et sur quelques sections arbitraires. Cette méthode nous paraît bien moins précise que l'étude du poids des organes, en particulier pour la rate et le foie ; elle ne recoupe pas absolument nos résultats précédents mais conduit cependant à un classement semblable. Le nombre d'animaux présentant des lésions apparentes a été : dans le groupe I : de 2 pour la rate, 1 pour le foie, 3 pour les poumons ; dans le groupe II, respectivement de 2, de 3 et de 5 ; dans le groupe III, de 4, 3 et 4 ; et de 6, 6, 6 dans le groupe témoin où les lésions étaient en outre beaucoup plus considérables.

RICHESSE DES ORGANES EN BACILLES. — La richesse des organes en bacilles, étudiée par *culture* constitue un test bien plus démonstratif. Le nombre de milieux nécessaires pour une étude de ce genre, nous a contraint à nous limiter à un seul organe ; la rate devait évidemment être choisie. Il nous a paru indispensable d'ensemencer des dilutions

(20) LANGE et LYDTIN. *Zeitschr. Hyg.*, 1929, **110**, 209.

(21) Obtenu ici en prenant la moyenne des deux poids situés à égale distance des extrêmes.

équivalentes obtenues à partir du broyage de l'organe entier et non d'une fraction arbitrairement choisie plus ou moins riche en granulations. Chaque rate était donc broyée en totalité au mortier à la poudre de verre, triturée avec une quantité d'eau distillée correspondant à dix fois son poids (émulsion à 0,10 par centimètre cube). Pour éviter la persistance de gros grumeaux cette émulsion était centrifugée dix minutes à 3.000 tours ; 3 c. c. de liquide clair étaient ensuite prélevés, traités par 1,5 c. c. d'acide sulfurique à 15 p. 100 pendant dix minutes et neutralisés par la soude à 30 p. 100 ; on complétait le volume à 6 c. c. et l'on diluait au 1/10 et au 1/1.000 ; 2 c. c. de chaque émulsion correspondant à 0,10, 0,01 et 0,0001 de rate étaient répartis sur 3 tubes de milieu de Löwenstein. 216 tubes ont été ainsi utilisés.

Cette étude nous a donné des résultats décevants. Les dilutions extrêmes se sont montrées trop riches ou trop pauvres pour permettre des lectures comparatives. La dilution moyenne correspondant à 0,01 de rate aurait offert plus d'intérêt, si certains tubes ensemencés avec des organes certainement pathologiques n'étaient restés stériles, ce qui ôte malheureusement beaucoup de leur valeur aux résultats négatifs. Aussi ne publions-nous nos résultats qu'à titre indicatif.

Nous avons cherché également, pour la rate, le foie et le poumon, à numérer les bacilles sur lame. Il nous est apparu vain de comparer des frottis de granulations ; nous avons broyé soigneusement la totalité de l'organe à la poudre de verre, fait des frottis avec la pulpe ainsi obtenue, et examiné 100 champs par lame. Les bacilles se sont montrés trop rares pour que ce procédé nous ait paru présenter dans notre cas une véritable signification.

L'ÉTUDE ANATOMO-PATHOLOGIQUE a porté sur le foie, la rate, les poumons, les ganglions d'un cobaye de chaque série. Les fragments pathologiques examinés n'ont pas révélé de différences très manifestes ; en particulier les animaux désensibilisés ont présenté comme les autres de larges nodules caséux avec bacilles de Koch. Ces nodules étaient bien plus rares et l'ensemble des lésions beaucoup moins étendu chez les cobayes traités que chez les témoins, mais il nous a été impossible de reconnaître par les seuls aspects histologiques s'il s'agissait d'un animal désensibilisé ou simplement peu tuberculeux. La désensibilisation telle que nous l'avons pratiquée ne modifie donc pas la nature des réponses de l'organisme tuberculeux aux composants chimiques du bacille de Koch, bien qu'elle en atténue l'intensité.

En résumé, nous avons observé une diminution des lésions tuberculeuses des cobayes désensibilisés par la tuberculine ou traités par le sulfamide, par rapport à celles des témoins. Cette diminution est nettement plus significative chez les cobayes à la fois désensibilisés et sulfamidés.

Le fait qu'il s'agit d'une constatation seulement statistique et le nombre restreint d'animaux sur lequel nous avons expérimenté, nous empêchent de donner à nos chiffres tout leur poids. Cependant si l'on considère que notre expérimentation, en ce qui concerne la tuberculine ou le sulfamide, ne fait que rejoindre celles

d'autres auteurs, on peut tenir également pour valables les résultats nouveaux que nous apportons concernant l'association sulfamido-tuberculine. Aussi n'est-il pas interdit d'examiner dès à présent si cette expérience comporte quelques sanctions pratiques.

Il pourrait sembler qu'un produit capable de ralentir l'évolution d'une tuberculose granulique de primo-infection inéluctablement mortelle, comme celle du cobaye, avait quelques chances d'être actif sur une affection chronique curable comme la tuberculose humaine. Or, l'échec de la sulfamidothérapie est patent en clinique ; nous-même avons eu l'occasion de suivre il y a quelques années une tuberculeuse qui avait absorbé par erreur 3 g. de septoplix tous les jours pendant deux mois et huit jours. Cette absorption de 207 g. de sulfamido avait été aussi parfaitement tolérée que complètement inactive. C'est que le problème, chez l'homme, n'est pas de ralentir la multiplication d'un germe qui essaime et édifie sans cesse de nouvelles lésions. La tuberculose pulmonaire est une maladie locale ; lorsqu'elle débute aux yeux du clinicien, l'essentiel de son histoire biologique est déjà terminé. On découvre une caverne, mais c'est déjà une lésion presque exclue de l'organisme ; la prolifération des bacilles y est tantôt discrète, tantôt prodigieuse, équivalant chaque jour à des tubes entiers de culture, mais c'est une prolifération de surface qui n'a pas accès dans l'organisme. Qu'on supprime les conditions favorables à ce développement local en laissant la cavité se rétracter et la maladie est guérie.

C'est dans les primo-infections sévères, dans les typho-bacilloses, les tuberculoses miliaires, les poussées extensives aiguës, toutes éventualités où nous sommes désarmés, que la sulfamidothérapie pourrait revendiquer une modeste place, si la toxicité du produit à doses suffisantes n'en rendait un usage prolongé aléatoire.

Quant à la tuberculinothérapie, qui ne voit combien elle est différente de l'action obtenue chez notre cobaye où des doses massives, antérieures même à l'infection, s'opposent au développement de l'allergie ? La tuberculinothérapie s'adresse au contraire à un organisme déjà hypersensible ; elle tend à provoquer chaque fois une petite réaction locale, dont l'action congestive, résolutive, puis sclérosante, est sans doute à la fois le danger et le mode d'efficacité.

Néanmoins là aussi un enseignement paraît résulter de notre expérience ; il confirme les idées que nous avons exposées sur l'allergie : c'est que la suppression de l'hypersensibilité cutanée et générale peut favoriser la défense organique. Ainsi s'expliquent peut-être l'action prolongée et les résultats tardifs qu'on connaît au traitement tuberculinaire. Mais nous voyons aussi l'intérêt, cette désensibilisation une fois obtenue, de la maintenir de façon prolongée, au lieu d'arrêter le traitement comme il est de règle.

L'action de la chimiothérapie pratiquée à ce moment mériterait peut-être d'être essayée.

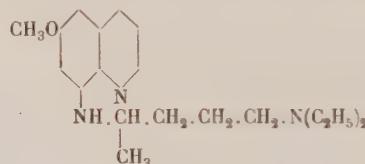
Cette association de la tuberculine et des sulfamides ne nous paraît pas avoir agi chez nos cobayes à la façon de deux facteurs favorables conjoints, mais d'une action combinée : l'atténuation des phénomènes allergiques tissulaires permettant au produit chimique d'atteindre plus facilement le germe. Nous avons avancé qu'il ne s'agit pas là d'une particularité de ces deux corps, mais d'une loi générale réglant la chimiothérapie de la tuberculose. La découverte d'un agent désensibilisant non toxique, ne provoquant pas de réactions focales, et l'adaptation plus étroite d'un corps, sulfamidé ou non, au bacille tuberculeux, nous paraissent une voie de recherche susceptible d'aboutir à des résultats effectifs.

QUINOLÉINES A CHAINE LATÉRALE ARYLALIPHATIQUE DOUÉES DE PROPRIÉTÉS ANTIMALARIAQUES

par A. FUNKE, D. BOVET, G. MONTÉZIN (*).

(Institut Pasteur, Laboratoire de Chimie thérapeutique.)

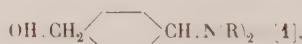
Depuis la découverte des propriétés antimalariaques de la Plasmoquine : α -diéthylamino-isopentylamino-8 méthoxy-6 quinoléine



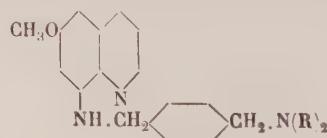
en 1926, un nombre considérable de synthèses ont été effectuées en modifiant, soit le noyau quinoléinique, soit la chaîne latérale.

Les travaux systématiques poursuivis dans le laboratoire de chimie thérapeutique de l'Institut Pasteur occupent une place importante dans ces recherches. Il en résulte que la chaîne latérale de la plasmoquine n'a pas une action spécifique, mais qu'il suffit du groupement général : noyau-N-chaîne carbonée-N(R)₂ pour qu'une action antimalariaque plus ou moins prononcée puisse être observée.

Ayant réussi à faire la synthèse d'aminoalcools nouveaux du type :



nous avons combiné leurs dérivés halogénés à la méthoxy-amino-quinoléine pour obtenir des corps ayant la formule suivante :



Il était en effet intéressant d'observer l'influence du noyau aromatique intercalé dans la chaîne carbonée latérale, de telles chaînes

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 5 juillet 1945.

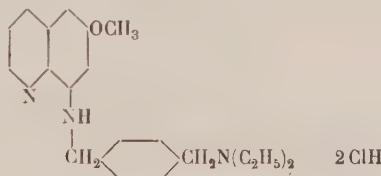
n'ayant encore jamais à notre connaissance été attachées sur la molécule quinoléinique.

L'effet antimalarien de tels produits ayant été constaté, nous avons — toujours par analogie avec la plasmoquine — fixé la même chaîne arylaliphatique sur la méthoxy-2 dichloro-6-9 acridine, espérant obtenir ainsi un produit possédant des propriétés analogues à celles de l'atébrine.

I. — Partie chimique.

Nous exposerons d'abord la préparation et les propriétés chimiques de ces corps.

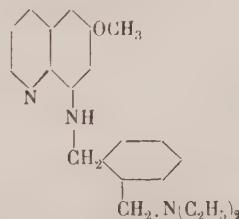
Diéthylaminométhyl-4' benzylamino-8 méthoxy-6 quinoléine (2236 F).



Une dissolution alcoolique chaude d'une mol. de bromhydrate de diéthylaminométhyl-4 bromométhylbenzène [1] est traitée par 2 mol. de méthoxy-6 amino-8 quinoléiné. Après quelques heures de repos on essore les cristaux du bromhydrate de la méthoxy-aminoquinoléine et on élimine l'alcool du filtrat par évaporation. Le résidu est extrait par l'éther en présence d'un excès de soude caustique. La solution éthérée est séchée et évaporée, le produit de condensation passe entre 280 et 295° sous 3 mm. Le chlorhydrate fond vers 225°.

Dosage : Subst. 0,3910 ClH N/10 Calc. 41,2 c.c. Tr. 41,4 c.c.
(monochlorhydrate).

Diéthylaminométhyl-2' benzylamino-8 méthoxy-6 quinoléine (2389 F).

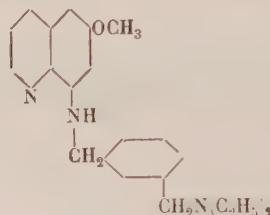


On commence par effectuer la condensation entre méthoxy-

aminoquinoléine et bromhydrate de diéthylaminométhyl-2 bromométhylbenzène [4], comme cela est indiqué plus haut. Mais au lieu de reprendre le résidu alcoolique par l'éther en présence d'alcali, on ajoute simplement de l'eau. Il se sépare ainsi un produit cristallin qui fond entre 130 et 132°. L'analyse montre que nous sommes en présence du monobromhydrate du corps cherché.

Dosage : Br. Calc. 9,61 p. 100 Tr. 9,63 p. 100.

Diéthylaminométhyl-3' benzylamino-8 méthoxy-6 quinoléine.



Se prépare en partant du chlorhydrate de diéthylaminométhyl-3 chlorométhylbenzène [4].

Dosage : Subst. 0,213 ClH N/10 Calc. 6,1 c.c. Tr. 5,9 c.c.

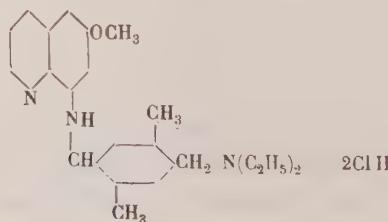
Diméthylaminométhyl-4' benzylamino-8 méthoxy-6 quinoléine
(2244 F).

Ce dérivé diméthylé est obtenu d'une façon tout à fait analogue au dérivé diéthylé en para que nous venons de décrire en mettant en réaction le bromhydrate de diméthylamino-méthyl-4 bromométhylbenzène [4].

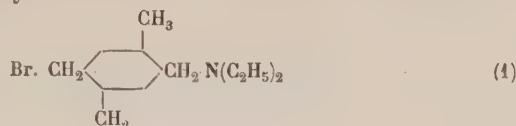
$E_{\text{b}3\text{mm}} = 275-278^\circ$

Dosage : Subst. 0,3042 ClH N/10 Calc. 10,25 c.c. Tr. 10,3 c.c.
(monochlorhydrate)

Diéthylaminométhyl-4' diméthyl-3''-6' benzylamino-8 méthoxy-6 quinoléine (2247 F).



La base bromométhylée



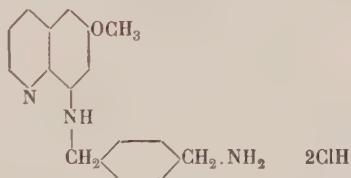
est très stable et on peut la faire réagir à l'état libre avec la quinoléine. Les conditions d'opération restant toujours les mêmes.

$E_{\text{b}^{\text{1mm}}} = 270^\circ$.

Dosage : Subst. 0,296 ClH N/10 Calc. 8,38 c.c. Tr. 8,3 c.c.
(monochlorhydrate)

Il était intéressant de comparer l'action antipaludique entre le 2236 F dans lequel l'azote final de la chaîne latérale est disubstitué, avec la même molécule comportant une fonction amine primaire. Nous avons préparé dans ce but :

Aminométhyl-4' benzylamino-8 méthoxy-6 quinoléine (2409 F).



On part de la *p*-éthoxyméthyl-benzylamine :



dont la fonction aminée est bloquée à l'état de phtalimide [2]. La fonction éthoxy est ensuite coupée par passage de gaz chlorhydrique dans une solution alcoolique chaude du dérivé phtalimidé. Au bout de trois heures, il y a précipitation du chloro-méthylbenzylphtalimide :



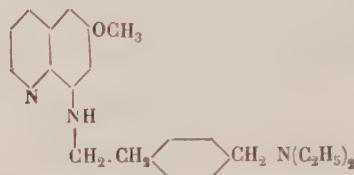
Après recristallisation, le produit fond à 149°.

Dosage : Cl. Calc. 12,4 p. 100 Tr. 12,12 p. 100.

La condensation avec la méthoxyaminoquinoléine se fait à 120° en tube scellé et en présence de benzène. Il suffit ensuite de couper le reste phtalimidé par l'hydrate d'hydrazine [3]. Le dichlorhydrate est recristallisé dans l'alcool. Il est très soluble dans l'eau.

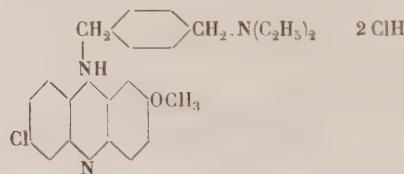
F = 220-230°.

Dosage : Cl. Calc. 19,36 p. 100 Tr. 19,51 p. 100,

Diéthylaminométhyl-4' phénylethylamino-8 méthoxy-6 quinoléine (2349 F).

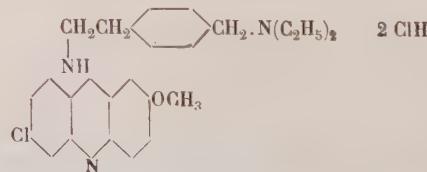
Se prépare par réaction de 2 mol. de méthoxy-aminoquinoléine sur 1 mol. de chloréthyl-4 diéthylbenzylamine [4] en tube scellé à 120°. La base distille entre 275° et 280° sous 2,5 mm.

Dosage Cl p. 100 (dichlorhydrate) Calc. 9,629 Tr. 9,42

Diéthylaminométhyl-4' benzylamino-9 méthoxy-2 chloro-6 acridine (2363 F).

Nous avons préparé ce dérivé acridinique suivant la méthode indiquée dans le brevet DRP 571.449 de l'I. G. en combinant la méthoxy-2 dichloro-6-9 acridine avec la *p*-diéthylaminométhyl benzylamine [4] en présence de phénol. Le dichlorhydrate est une poudre jaune clair hygroscopique facilement soluble dans l'eau. Point de décomposition vers 275°.

Dosage : N p. 100 Calc. 8,290 Tr. 8,270

Diéthylaminométhyl-4' phénylethylamino-9 méthoxy-2 chloro-6 acridine

Préparation identique à celle ci-dessus par condensation avec la

diéthylaminométhylphénylethylamine. Dichlorhydrate F = 190°.

Dosage : N p. 100 Calc. 8,069 Tr. 7,97

II. — Propriétés thérapeutiques.

A. — DÉRIVÉS QUINOLÉINIQUES.

Parmi les dérivés étudiés, c'est le chlorhydrate de diéthylaminométhyl-4' benzylamino-8 méthoxy-6 quinoléine, ou 2236 F qui a particulièrement retenu l'attention. Il exerce sur l'infection expérimentale aviaire une activité antimalarique caractéristique et il nous a paru que sa faible toxicité et son coefficient chimiothérapeutique très favorable justifiaient une expérimentation clinique.

Les essais d'activité sur l'oiseau ont été effectués sur l'infection du canari par un *Plasmodium relictum*, selon la technique couramment utilisée à l'Institut Pasteur (1) : inoculation intrapéritonéale du canari du sang provenant d'un oiseau infecté ; traitement par voie sous-cutanée pendant six jours ; examens quotidiens du sang frais ; la dose du médicament injectée est considérée comme efficace dans les essais où les deux oiseaux traités présentent par rapport aux témoins un retard de l'infection supérieur à trois jours.

Les doses tolérées et toxiques ont été déterminées d'une manière approchée sur le canari et avec plus de précision pour la souris.

1° Chez le canari la dose minima active de 2236 F est de 1/20 de milligramme par oiseau, la dose tolérée de 2,5 mg. et la dose toxique de 5 mg. ; l'indice chimiothérapeutique est donc de 1/50.

Le détail des essais est donné par le tableau I et la figure ci-jointe ; un second tableau permettra de comparer ces résultats avec ceux que fournissent les autres antimalariques de synthèse.

2° Sur la souris les doses 50 p. 100 mortelles sont les suivantes :

Par voie intraveineuse 0,8 mg. par 20 g. (correspondant à 40 mg. par kilogramme).

Par voie sous-cutanée ou buccale. 2 mg. par 20 g. (correspondant à 100 mg. par kilogramme).

La résorption du produit par voie buccale se fait donc très rapidement.

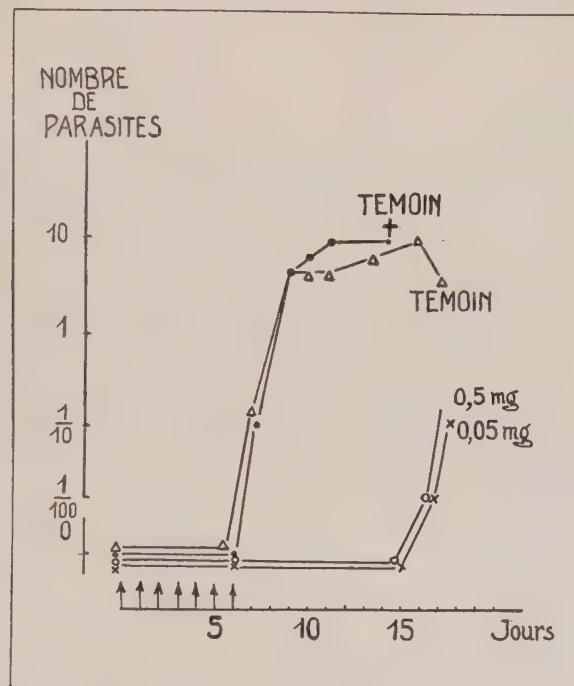
3° Chez le lapin on a observé, par voie veineuse, la survie de l'animal après l'injection intraveineuse de 10 mg. par kilogramme et la mort dans un essai sur deux après 15 mg. par kilo-

(1) La souche de *Plasmodium* actuellement utilisée a été recueillie en 1941 sur des moineaux spontanément infectés capturés dans la région parisienne ; elle est depuis lors conservée sur canari au laboratoire.

TABLEAU I. — Action du 2236 F sur l'infection à *Plasmodium relictum* du canari. — Traitement préventif pendant les six jours qui suivent l'inoculation.

gramme ; par voie sous-cutanée la dose de 80 mg. par kilogramme permet la survie et la dose de 100 mg. par kilogramme est mortelle.

4° Chez le chien éveillé, par voie sous-cutanée, 20 mg. par kilogramme de 2236 F sont sans effet appréciable ; 50 mg. par kilogramme provoquent des vomissements et des mouvements



Action du 2236 F sur l'infection du canari par le *Plasmodium præcox*. Retard de l'infection à la suite d'un traitement préventif par 0,5 0,05 mg. (tableau I) [essai n° III].

convulsifs peu violents, après lesquels l'animal se remet complètement en quelques heures.

5° L'injection de 2236 F provoque chez le chien chloralosé une hypotension passagère à 10 mg., durable à 30 mg. par kilogramme ; on constate une légère diminution de l'excitabilité vagale. La solution à 1 p. 100 ne provoque, en instillation sur l'œil du lapin, qu'une anesthésie partielle et peu importante.

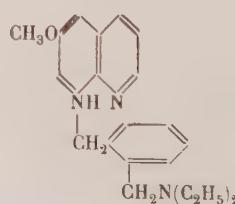
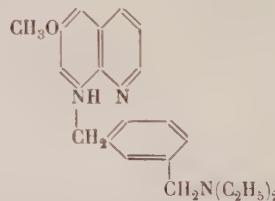
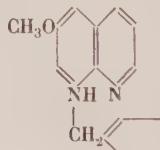
Nous avons examiné l'effet de la substitution, sur le même

TABLEAU II. — Toxicité et activité antimalariaque du chlorhydrate de diéthylaminométhyl-4' benzylamino-8 méthoxy-6 quinoléine (2236 F). Comparaison avec les médicaments connus. *Plasmodium praecox* du canari. Sous-cutané en milligramme par 20 grammes.

	2236 F	PRÉQFINE [Planochin] (1)	RHOODOQUINE [710 F] (2)	QUINACHINE [Atebri] (3)
Dose minima active	0,05	0,0025	0,04	0,25
Dose tolérée et dose toxique	2,5 5,0	0,25 0,5	0,25 0,5	3,0 4,0
Index chimiothérapique: dose maxima active dose maxima tolérée	1 50	1 100	1 25	1 12

noyau de la méthoxy-6 amino-8 quinoléine, d'autres groupements voisins de la *p*-diéthylaminométhylbenzylamine.

Les écarts sont particulièrement importants pour les trois isomères de position suivante :



Activité antimalarique : $\frac{C}{T} = \frac{1}{50}$.

Activité antimalarique : $\frac{1}{5}$.

Activité antimalarique :

Le tableau III groupe l'ensemble des résultats obtenus :

TABLEAU III. — Toxicité et activité antimalariaque des dérivés nouveaux.

		CANARI		SOURIS Dose mortelle L. 50 sous-cutanée (mg./kg.)	CANARI Indice chimiothérapeutique (C/I)
		Dose tolérée et toxique sous-cutanée (mg./kg.)	Dose minima active sous-cutanée (mg./kg.)		
A					
a)	Diéthylaminométhyl-4' benzylamino-8 méthoxy-6 quinoléine	2236 F	2,5-5	0,05	2 1/50
	Diéthylaminométhyl-3' benzylamino-8 méthoxy-6 quinoléine.	3128	0,5-1	0,1	2 1/5
	Diéthylaminométhyl-2' benzylamino-8 méthoxy-6 quinoléine	2389 F	1-2	Sans action.	10
b)	Aminométhyl-4' benzylamino-8 méthoxy-6 quinoléine	2409 F	1-2	0,1	4 1/10
	Diméthylaminométhyl-4' benzylamino-8 méthoxy-6 quinoléine.	2244 F	1-2	0,05	2 1/20
	Diéthylaminométhyl-4' phénylethyl-amino-8 méthoxy-6 quinoléine.	2349 F	2-5	0,1	1/20
	Diéthylaminométhyl-4' diméthyl-3'-4' benzylamino-8 méthoxy-6 quinoléine .	2247 F	2-5	0,05	4 1/40
B					
	Diéthylaminométhyl-4' benzylamino-9 méthoxy-2 chloro-6 acridine . . .	2263 F	1-2	0,25	25 1/4
	Diéthylaminométhyl-5' phénylethylamino-9 méthoxy-2 chloro-6 acridine.	2213 F	1-2	Sans action.	10

B. — DÉRIVÉS ACRIDINIQUES.

Dans la molécule du 2236 F la chaîne amino alcoyl de la Rho-douquine ou de la Præquine se trouve remplacée par un groupement aminoaryl aromatique. La même transformation dans la série de l'acridine permet de passer de la structure de la quinacrine à celle du chlorhydrate de diéthylaminométhyl-4' benzylamino-9 méthoxy-2 chloro-6 acridine (2263 F).

Ce nouveau dérivé est encore antimalarial et la dose minima active chez l'oiseau correspond à celle de la quinacrine. Il se montre aussi bien ou mieux toléré que ce médicament chez la souris.

RÉSUMÉ.

Plusieurs produits de condensation de l'amino-8 méthoxy-6 quinoléine et de l'amino-9 méthoxy-2 chloro-6 acridine avec des aminoalcools arylaliphatiques $\text{OH CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{NR}_2$ manifestent

des propriétés antimalariques dans l'infection expérimentale du canari par le *Plasmodium praecox*.

Le chlorhydrate de diéthylaminométhyl-4' benzylamino-8 méthoxy-6 quinoléine, ou 2236 F, représente le plus actif de la série ; c'est un produit relativement peu toxique et dont l'index chimiothérapeutique est de 1/50.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] FUNKE (A.) et ROUGEAUD (O.). *Bull. Soc. Chim. Franç.*, 1945, **42**, 1050.
- [2] WANAG (G.). C. (1939), II, 3815. — BERR (A.), C (1940), I, 3113.
- [3] BRATTON et MARSHALL. *J. Biol. Chem.*, 1939, **128**, 537.

ASSOCIATION DES MICROBIOLOGISTES DE LANGUE FRANÇAISE

(*Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.*)

AVERTISSEMENT

Les communications qui suivent ont été présentées aux séances de l'*Association des Microbiologistes de langue française* tenues à Paris sous l'occupation, et discutées en séance.

La législation imposée à cette époque par l'occupant n'ayant pas permis leur publication, elles n'ont pu, de ce fait, paraître à leur place normale avec le compte rendu des séances où elles ont été présentées.

Il y a lieu de noter, en outre, que la communication intitulée *Action des rayons lumineux sur le bactériophage* parue dans ces *Annales* en mars 1942, 68, 245, et signée par A. Guelin, doit être signée de R. Wahl et A. Guelin.

LE DÉTERMINISME PHYSIQUE ET LA VIE

par G. SANDOR (*).

Des modèles assez adéquats ont pu être construits ces dernières années pour le substratum physico-chimique de la respiration, de la fermentation et de la contractilité musculaire (Meyerhof, Szent Györgyi, Krebs, etc.). Il en découle que des processus essentiellement irréversibles dans leur ensemble se décomposent fort probablement dans les cellules en une série de grand nombre de réactions intermédiaires, réversibles pour la plupart. La représentation des phénomènes vitaux en phase fluide et homogène se heurte dans ces conditions à deux difficultés insurmontables : à l'indétermination physique qui résulte de la petitesse de la plupart des cellules, en général, ou de la petitesse de la partie réactionnelle de certaines cellules et, contrastant avec cette indétermination physique, au déterminisme indiscutable des processus vitaux cellulaires.

(*) Séance du 2 octobre 1941.

Détermination biologique des cellules : En effet, on ne peut pas admettre que la vie d'un grand nombre de cellules soit simplement la moyenne statistique de celle des cellules individuelles. Chacune d'elles est déterminée physiologiquement et anatomiquement non seulement dans la colonie d'un être unicellulaire, mais aussi dans un organe ou un tissu d'un être évolué. En dehors des caractères structuraux immuables d'une espèce cellulaire donnée, trois séries de faits d'ordre dynamique plaident aussi en faveur de cette conception. Ainsi une culture microbienne peut être obtenue à partir d'une bactérie unique. La culture des tissus prouve, d'autre part, que chaque cellule individuelle d'un être supérieur garde encore tous les attributs nécessaires pour vivre et se reproduire à elle seule. Enfin une partie seulement des noyaux des cellules de la lignée sexuelle paraît contenir potentiellement les innombrables caractères héréditaires de l'organisme adulte.

Petitesse des cellules et fluctuations thermodynamiques : En calculant d'après les dimensions microscopiques les poids à l'état humide des différentes cellules dans des conditions simplifiées (configurations sphériques ou cylindriques, densité égale à l'unité), nous obtenons les chiffres approchés suivants : Cellules bactériennes : $5,10^{-5}$ à 10^{-12} g. Erythrocytes : 10^{-12} g. Lymphocytes : 10^{-11} g. Si nous admettons, d'autre part, que de telles cellules contiennent, pour une teneur en protéides de 20 p. 100, 50 protéides-diastases différents d'un poids moléculaire moyen de 100.000, les plus petites bactéries renfermeront 118 molécules d'une espèce diastasique donnée et un lymphocyte 235.000 environ. Une série d'autres calculs encore plus directs peuvent être faits. Warburg (1) trouve qu'un gramme de levure sèche contient $3,10^{-8}$ à $4,10^{-7}$ g. de fer. En admettant un résidu sec de $3,10^{-13}$ g. pour chaque cellule et en tenant compte du fait que les atomes de fer se distribuent parmi des catalases, des peroxydases et 2 ou 3 cytochromes, 15 à 200 molécules seulement seraient présentes pour une diastase donnée. En prenant les teneurs en co-zymase et co-carboxylase des levures d'après Meyerhof et Ohlmeyer (2), nous calculons 500.000 à 100.000 molécules respectivement pour chacune d'elles par cellule. Pourtant nous savons que ces « groupements prosthétiques » doivent être en large excès moléculaire par rapport aux protéide-diastases correspondants [voir par exemple : Negelein et Wulff (3)], dont il y a d'ailleurs plusieurs pour chacun d'eux. Il est ainsi presque certain que des réactions chimiques réversibles, donc obéissant à des équations d'équilibre, peuvent se faire parmi quelques milliers ou éventuellement même parmi quelques centaines de molécules individuelles seulement au sein des cellules vivantes.

Pour un cas relativement simple, tel que la réaction de stéréoisomérisation de l'acide glucose-6-phosphorique en l'acide lévulose-6-phosphorique [Lohmann (4)], nous pouvons calculer d'après Donnan (5) les rapports des probabilités thermodynamiques d'un état dévié donné sur la probabilité thermodynamique de l'état d'équilibre,

(1) WARBURG, *Biochem. Zeitschr.*, 1928, **203**, 95 ; 1929, **214**, 101.

(2) MEYERHOF et OHLMAYER, *Biochem. Zeitschr.*, 1937, **290**, 334.

(3) NEGELEIN et WULFF, *Biochem. Zeitschr.*, 1937, **289**, 436 ; **290**, 445.

(4) LOHMANN, *Biochem. Zeitschr.*, 1933, **262**, 137.

(5) DONNAN, *J. gen. Physiol.*, 1925-1927, **8**, 685.

seul possible dans les systèmes « macroscopiques ». Nous avons réuni les chiffres calculés pour ces rapports ci-après :

Probabilités thermodynamiques relatives pour un état dévié donné de l'équilibre thermodynamique.

Réaction : acide glucose-6-phosphorique; acide lévulose-6-phosphorique.
Constante d'équilibre : 3.

a) *Déviation de 1 p. 100 :*

Nombre de molécules	100	1.000	10.000	100.000
Probabilité relative	0,97	0,767	0,07	$10^{-11,6}$

b) *Déviation de 10 p. 100 :*

Nombre de molécules	100	1.000	10.000	
Probabilité thermodynamique relative	0,07	$10^{-11,6}$	$10^{-115,8}$	

Ces chiffres prouvent que les cellules correspondent à des grandeurs fluctuantes.

Discussion : Si les processus biologiques se faisaient en phase fluide et homogène il faudrait ainsi admettre l'existence d'un « démon de Maxwell » molécule consciente, au sein des cellules, vu le déterminisme biologique. Les limitations quantiques des probabilités doivent devenir cependant fort importantes en phase solide, microhétérogène et anisotrope. Un élément cristallin par exemple n'est nullement la moyenne statistique de tous les éléments qu'un cristal macroscopique contient. La matière vivante n'est pas solide, mais aux interfaces les molécules protéïdiques et lipidiques, rigidement polarisées elles-mêmes, adsorberont en polarisation invariable d'autres molécules dipolaires. Le système ne subira alors que des mouvements oscillatoires, d'une part ; il ressemblera, d'autre part, beaucoup à un système microhétérogène et anisotrope. Ainsi le déterminisme physique pourrait se rétablir, si les processus vitaux étaient localisés aux interfaces au sein des cellules.

**MODIFICATION PROFONDE (MUTATION)?
D'UN STAPHYLOCOQUE
SOUS L'INFLUENCE DU BACTÉRIOPHAGE**

par R. WAHL (*).

L'apparition des « cultures secondaires » après la lyse par le bactériophage a été observée pour de nombreux germes.

Trois éventualités sont possibles :

1° Les germes qui « repoussent » ne diffèrent en rien de ceux qui ont été lysés, et si on les ensemence sur un milieu neuf contenant du bactériophage, ils se lysent comme les premiers.

(*) Séance du 6 novembre 1941.

2^o Les cultures secondaires résistent à l'action du bactériophage, mais elles sont composées de germes qui ont le même aspect et les mêmes caractères de culture que les premiers.

3^o Les cultures secondaires sont résistantes, mais elles n'ont pas le même aspect que les premières. Elles appartiennent, par exemple, à la variété R, alors que le germe lysé était de la variété S (Bordet et Ciua, Hadley, Burnet).

Dans ce dernier cas, le germe paraît avoir subi une variation, qui ne diffère, d'ailleurs, pas des variations spontanées. En effet, une souche S peut donner naissance à des colonies R en l'absence de bactériophage.

On ne connaît pas jusqu'ici les cultures secondaires du staphylocoque mort parce qu'on ne s'était pas placé dans les conditions nécessaires : maintenir longtemps la culture lysée à 37°. Nous avons pu les observer en procédant ainsi, et nous avons constaté qu'elles renferment plusieurs variétés de germes, dont l'une d'elles diffère plus que d'habitude du germe primitif, à tel point qu'elle rappelle le streptocoque par plusieurs caractères.

Voici notre expérience initiale :

10 c. c. de bouillon sont ensemencés dans un ballon avec une culture de dix-huit heures sur gélose de staphylocoque blanc de la souche Twort et additionnés de II gouttes d'un lysat bactériophagique du même microbe. Le titre de ce bactériophage est 3×10^{-7} . Le mélange est placé dans un bain-marie à 37° et soumis à une agitation mécanique régulière (120 secousses par minute). La lyse se produit au bout de trois heures, avec clarification complète.

Au bout de cinquante heures environ, le bouillon se trouble à nouveau, l'aspect de la culture secondaire est différent de la culture initiale. Celle-ci était très abondante, troubant uniformément le liquide. Celle-là est peu abondante, en flocons. Par le repos, elle se dépose rapidement au fond du tube, et elle est surmontée d'un liquide clair.

D'emblée l'aspect microscopique diffère de celui du staphylocoque, comme nous le verrons plus loin.

Réensemencés sur les milieux ordinaires (bouillon ou gélose) ces germes poussent lentement et très peu abondamment.

Sur gélose nous avons obtenu de très rares colonies. Elles étaient de deux types différents.

Les unes étaient punctiformes d'un blanc grisâtre, ayant apparu au bout de quarante-huit heures, les autres plus grandes et jaunâtres se développant vingt-quatre heures plus tard.

Les germes isolés à partir de chacune des deux espèces de colonies sont différents :

Le premier germe (type A) ne peut être ni isolé, ni entretenu sur les milieux ordinaires. Déjà le deuxième passage sur gélose ou sur bouillon reste stérile. Par contre, il peut être repiqué indéfiniment sur les mêmes milieux additionnés de glucose, de sérum de cheval frais, d'« ascite-sérum » de l'Institut Pasteur ou de sang. Il garde toujours ses caractères, et conservé en gélose profonde pendant cinq mois, réensemencé sur gélose-ascite-sérum il reste identique à lui-même. C'est donc une forme stable.

Sur les milieux solides, les colonies se développent lentement en

vingt-quatre à quarante-huit heures : elles sont petites (1 mm. de diamètre environ), plates, opaques, blanchâtres, très sèches (fig. 1) se détachant en bloc au contact de l'anse de platine. Elles se dissocient mal dans l'eau physiologique ou le bouillon, et il est impossible d'en obtenir une suspension homogène.

Sur gélose glucosée, les colonies sont assez clairsemées. Sur gélose



FIG. 1.

à l'ascite-sérum, elles sont plus nombreuses, mais ne confluent pas. C'est le milieu de choix pour l'entretien de cette souche.

Sur gélose au sang, les cultures se développent mieux encore, et il est possible, en ensemencant abondamment d'obtenir une couche continue assez épaisse.

Sur les milieux liquides appropriés, le germe pousse beaucoup plus rapidement et plus abondamment. En quelques heures le liquide se trouble, et au bout de vingt-quatre heures, on obtient un épais dépôt microbien au fond d'un liquide clair.

En particulier, le bouillon glucosé est un milieu très favorable.

Sur bouillon additionné d'un tiers de sérum de cheval, la culture, un peu moins abondante, est très fortement agglutinée.

Au microscope, ce sont des cocci disposés en chaînettes, souvent longues, surtout en milieu liquide. Les grains en sont plus gros que ceux du staphylocoque de la culture primitive.

Dans des cultures âgées (quarante-huit heures et plus), les grains sont inégaux, certains très gros ; des formes allongées, ellipsoïdes, sont interposées dans les chaînettes (fig. 2).

Ce germe ressemble donc à un streptocoque tant par ses caractères de culture que par sa morphologie.

Il ne liquéfie pas la gélatine et il n'est pas hémolytique. Il ne fixe



FIG. 2.

pas les agglutinines du sérum antistaphylocoque Twort (1). Il résiste à l'action du bactériophage du staphylocoque Twort.

Nous avons essayé sur lui l'action d'un bactériophage actif pour un grand nombre de souches de streptocoque : nous n'avons pas observé de lyse.

Ce germe n'est lysogène, ni pour le staphylocoque Twort, ni pour le streptocoque.

Le deuxième germe (type B) a été isolé à partir des grandes colonies jaunes. Il pousse très bien sur les milieux ordinaires.

(1) Le germe en question, étant spontanément agglutiné, ne peut être soumis à l'épreuve de l'agglutination. Mais on constate que le pouvoir agglutinant du sérum antistaphylocoque Twort n'est pas diminué après douze heures de contact avec lui.

Sur gélose ordinaire, ces colonies ont 3 ou 4 mm. de diamètre, elles sont épaisses, saillantes, présentant un centre jaune, plus saillant que le reste de la colonie, entouré d'une auréole blanche. Leur surface est un peu irrégulière. Elles sont sèches, se dissociant mal dans un liquide, moins mal cependant que les colonies de la souche 1. Il est à remarquer que la transformation d'un germe non pigmenté en germe chromogène a déjà été signalée pour d'autres microbes. En bouillon, elles donnent une culture abondante, troubant uniformément le liquide.

Au microscope, l'aspect est celui du staphylocoque. Ce germe est



FIG. 3.

résistant au bactériophage du staphylocoque Twort. Il n'est pas lyophile pour celui-ci.

Telles sont les deux souches que nous avons pu isoler d'une culture secondaire de staphylocoque Twort, dans les conditions précisées plus haut : lyse du staphylocoque soumis à l'agitation continue à 37° ; maintien de l'agitation, toujours à 37°, jusqu'à l'apparition de la culture secondaire.

Si l'on opère sans faire intervenir l'agitation, mais toujours à 37°, au bain-marie ou à l'étuve, la culture secondaire est beaucoup plus rarement obtenue et a des caractères différents : elle est plus abondante et trouble uniformément le liquide.

Vue au microscope, la culture montre un mélange d'amas et de courtes chaînettes de cocci.

Si on l'ensemence sur milieux ordinaires, on n'obtient pas de culture. Le germe était un staphylocoque semblable à celui qui a été

lysé, et sensible au bactériophage correspondant. C'est pourquoi il donne naissance à des germes qui se lysent aussitôt sous l'influence du bactériophage apporté avec la culture secondaire. On peut supposer que quelques staphylocoques sensibles au bactériophage avaient échappé au contact et à la fixation de celui-ci, et avaient ensuite fait souche.

Néanmoins, sur milieu ascite-sérum ou milieu au sang, on obtint parfois quelques germes du type A, qui autrement auraient passé inaperçus.

Dès lors on s'explique que la culture secondaire développée dans les conditions d'agitation continue ne comprenne que des germes résistants. Le brassage a permis la fixation du bactériophage puis la lyse de tous les germes sensibles.

Il convient d'expliquer l'apparition dans les cultures secondaires de germes qui non seulement résistent au bactériophage, mais encore diffèrent par nombre de caractères du germe primitif.

Pour d'Hérelle ces germes auraient acquis une immunité vis-à-vis du bactériophage.

Mais la plupart des auteurs (Bordet, Hadley, Gratia, Burnet) pensent que dans la culture primitive quelques germes résistants pré-existaient. Le bactériophage, en lysant les germes sensibles, permettrait aux germes résistants de se développer abondamment (action « sélective » du bactériophage).

Ceci paraît possible quand le germe résistant n'est qu'une variété du germe sensible, telle qu'elle apparaît spontanément dans les cultures. C'est le cas fréquent où le germe sensible est de la variété S, et le germe résistant de la culture secondaire, de la variété R.

Notre type B est bien un staphylocoque R.

Mais, en ce qui concerne le type A, cette explication est moins satisfaisante. On ne voit jamais apparaître spontanément dans les cultures de staphylocoque des germes ayant des caractères aussi différents de ceux du staphylocoque.

Il y a là quelque chose de plus qu'une simple variation au sein d'une espèce ; et on est en droit de penser à une véritable mutation microbienne sous l'influence du bactériophage.

(*Institut Pasteur. Service du Bactériophage.*)

ANTITOXINES ET PROANTITOXINES

par G. SANDOR et J.-J. PÉREZ (*).

La digestion pepsique met en évidence une fraction protéidique particulière dans les sérum antidiphétique et antitétanique de cheval (1, 2). Il s'agit d'une pseudoglobuline qui diffère cependant de

(*) Séance du 4 décembre 1941.

(1) POPE, *Brit. J. exper. Path.*, 1938, **19**, 245.

(2) SANDOR, *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **131**, 1224 ; *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1940, **22**, 129.

la pseudoglobuline classique par une très grande résistance au chauffage en milieu faiblement acide et par un point isionique relativement alcalin [pH 7,2 à 7,3 (2)]. Cette fraction constitue le 1/5 des globulines totales et renferme au moins 40 à 50 p. 100 de l'antitoxine. La proportion de protéides antitoxiques purs contenus dans ces pseudoglobulines particulières ne paraît dépendre que du titre antitoxique du sérum considéré (2). C'est ainsi, par exemple, que pour des sérums antidiphétiques titrant 450 à 500 unités, cette proportion est de 20 à 21 p. 100, elle est de 39 p. 100 environ pour les sérums titrant 1.100 à 1.200 unités et elle atteint 60 p. 100 pour des sérums contenant 1.800 unités. Au cours du chauffage en milieu légèrement acide (pH 4), le pouvoir antitoxique de cette globuline particulière diminue très lentement à partir d'un certain temps de chauffage sans que la globuline semble subir de dénaturation parallèle.

Ces faits semblent prouver que la fraction globulinique particulière préexiste dans le sérum antitoxique avant la digestion pepsique. Si la digestion est cependant indispensable pour séparer par un chauffage ultérieur cette fraction des autres protéides qui l'accompagnent, c'est sans doute parce qu'elle réalise des conditions physiques favorables à la coagulation sélective. On peut penser en outre que ces globulines particulières seraient en quelque sorte des préantitoxines à partir desquelles le protéide antitoxique proprement dit se formerait par une modification minime. D'autre part, comme l'avait déjà vu Pope (1), on ne peut isoler du sérum normal de cheval qu'une quantité très faible de ces pseudo-globulines particulières. Il est donc vraisemblable qu'elles se produisent au cours de l'immunisation.

Ces faits et leur interprétation viennent d'être confirmés par Pappenheimer, Lundgren et Williams (3). Ces auteurs montrent que le sérum antidiphétique de cheval contient une fraction globulinique tout à fait particulière déjà avant la digestion pepsique, fraction caractérisée — dans l'appareil de Tiselius — par une mobilité relativement très faible à pH 7,35 en présence d'un tampon phosphate de force ionique égale à 0,1. Cette fraction est différente des trois fractions globuliniques que Tiselius a décrites dans le sérum normal : elle n'existerait donc pas dans celui-ci. Elle contient l'antitoxine diphétique qui en constitue 43,5 p. 100 dans le cas d'un sérum titrant 1.100 unités par exemple. Pourtant le protéide antitoxique pur ne peut pas être séparé de la globuline inactive qui l'accompagne ni par électrophorèse, ni par diffusion, ni par ultracentrifugation. De plus, le mélange du protéide antitoxique avec la globuline inerte apparaît comme un corps homogène dans les expériences de diffusion.

La production des antitoxines dans l'organisme animal paraît donc être liée à l'apparition d'une fraction globulinique particulière. Rapelons qu'il en est de même pour les anticorps antibactériens tout au moins dans le cas du sérum de cheval. Heidelberger et Pedersen (4) trouvent, en effet, que les précipitines qui réagissent avec les polysaccharides pneumococciques sont supportées dans le cas du sérum de cheval

(3) PAPPENHEIMER, LUNDGREN et WILLIAMS, *J. exper. Med.*, 1940, **71**, 247.
71, 247.

(4) HEIDELBERGER et PEDERSEN, *J. exper. Med.*, 1937, **65**, 393.

par une fraction globulinique particulière ayant un poids moléculaire de 900.000 environ. Dans ce cas encore les protéides précipitants purs sont mélangés avec des globulines inertes de mêmes caractères physico-chimiques et ces deux constituants apparaissent simultanément au cours de l'immunisation. La ressemblance va même plus loin entre anticorps antibactériens et anticorps antitoxiques. En effet, Reiner et Reiner (5), Felton (6) et Chow et Goebel (7) trouvent que la fraction globulinique qui supporte les précipitines antipneumocytiques présente un optimum de précipitation relativement très alcalin (pH 7 environ) en présence de faibles quantités d'électrolytes. L'optimum de précipitation doit correspondre dans ces conditions au point isoionique et nous trouvons que celui-ci est relativement très alcalin (pH 7,2 à 7,3) également dans le cas de la fraction globulinique qui contient les antitoxines. Dans tous ces cas on serait en droit de considérer ces fractions comme des pro-anticorps. Le caractère spécial de ces pro-anticorps, présents à l'état de traces seulement dans les sérum normaux, proviendrait, peut-être, du fait qu'ils seraient produits par un organe particulier. Il est très important du point de vue immunologique que la transformation des ces pro-anticorps en anticorps proprement dits ne paraît s'accompagner d'aucune modification sensible de leurs propriétés physico-chimiques. Insistons surtout sur le fait que la vitesse d'électrophorèse de l'anticorps est la même que celle de son précurseur inactif. Ce fait, en effet, rend peu vraisemblable l'intervention directe des fonctions ionisées dans l'union entre l'antigène et l'anticorps. Finalement, dans cette hypothèse la genèse des groupements fixateurs à la surface de l'anticorps serait liée à des modifications purement stériques des restes d'acides aminés (ou éventuellement glucidiques), sans que la nature de ces restes change.

(Institut Pasteur. Service de Chimio-physique.)

QUELQUES PRÉCISIONS AU SUJET DE L'ACTION DE LA LUMIÈRE SUR LES BACTÉRIOPHAGES

par R. WAHL (*).

Dans un travail précédent, fait avec la collaboration de M^{me} A. Guelin (1), nous avons montré que les bactériophages S₁₃ et C₁₆ du bacille dysentérique Flexner perdent plus ou moins complètement leur activité sous l'influence des radiations visibles.

Des expériences préliminaires nous avaient de plus permis de sup-

(5) REINER et REINER, *J. biol. Chem.*, 1932, **95**, 345.

(6) FELTON, *J. Immun.*, 1932, **22**, 453.

(7) CHOW et GOEBEL, *J. exper. Med.*, 1935, **62**, 179.

(*) Séance du 4 juin 1942.

(1) Ces *Annales*, mars 1942, **68**, 245 (voir l'avertissement, p. 275).

poser que les radiations les plus actives se trouvaient du côté des plus courtes longueurs d'onde du spectre visible.

Nous pouvons maintenant apporter de nouveaux faits sur ce sujet.

Ils concernent, d'une part, la détermination de la partie active du spectre, d'autre part la sensibilité de différentes races de bactériophages aux radiations visibles.

Détermination de la partie active du spectre. — Pour ces recherches, nous avons utilisé à nouveau le bactériophage S_{13} , suivant la technique décrite dans notre première note, et en prenant les mêmes précautions.

L'exposition à la lumière solaire a été faite dans les mêmes conditions générales, mais en plaçant devant chacun des tubes contenant la suspension de bactériophage un écran en plexi-glace.

Chaque tube était enfermé dans une boîte de carton noir construite pour lui. Cette boîte présentait une ouverture (de même taille pour toutes les boîtes) dans laquelle l'écran était encastré. Le tube ne recevait de lumière qu'au travers de l'écran et il était placé de façon que la totalité du liquide soit éclairée uniformément.

Nous disposions de 6 écrans colorés et d'un écran blanc.

Les couleurs étaient les suivantes : bleu, vert, jaune serin, jaune chrome, orangé et rouge. Ces écrans sont beaucoup plus sélectifs que ceux de verre que l'on peut se procurer, comme le montrent les courbes d'étalonnage que M. Latarjet a bien voulu dresser (fig.)

Chaque expérience a été faite comparativement avec plusieurs écrans ou simultanément avec tous les écrans, avec toujours un témoin derrière l'écran blanc et un autre maintenu à l'obscurité.

Le tableau ci-joint donne les moyennes de toutes les expériences (pourcentage restant après les divers temps d'exposition derrière les différents écrans).

Un premier fait s'en dégage immédiatement : l'écran bleu laisse passer incomparablement plus de radiations actives que tous les autres écrans colorés. Les radiations actives sont donc presque uniquement celles dont les longueurs d'onde sont comprises entre 4.000 et 5.100 Å.

	BLANC (p. 100)	6 BLEU (p. 100)	5 VERT (p. 100)	4 JAUNE serin (p. 100)	3 JAUNE chrome (p. 100)	2 ORANGE (p. 100)	1 ROUGE (p. 100)	OBSCURITÉ (p. 100)
1/2 heure.	30	56	61	51		50	96	95
2 heures.	1,7	22	49			60	90	90
6 heures.	1,2	5,3	42	40	45	56	66	70

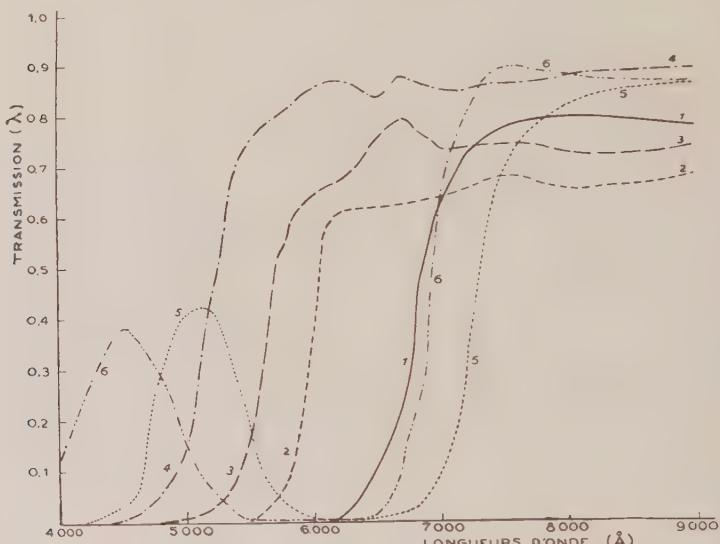
On peut même ajouter que c'est au voisinage du maximum de transparence de cet écran (4.500 Å) que se trouve la presque totalité de l'activité. En effet, dans cette région, l'écran transmet au maximum 38 p. 100 de la radiation reçue, alors que les quantités de bactériophage détruites derrière l'écran bleu atteignent 50 à 60 p. 100 de celles qui le sont dans le même temps au travers de l'écran blanc.

En tenant compte d'une certaine absorption possible de l'écran blanc, les deux destructions sont sensiblement équivalentes.

A l'autre extrémité du spectre visible, l'écran rouge吸erce la totalité du rayonnement actif.

Une conclusion pratique s'en dégage : pour éviter d'une façon générale les causes d'erreurs dues à l'action de la lumière, les manipulations sur les races particulièrement sensibles de bactériophages doivent être faites en lumière rouge.

Les rayons qui traversent tous les autres écrans (longueurs d'onde entre 4.800 et 6.800 Å) sont très peu actifs, et au fur et à mesure que,



dans cette zone, on se déplace vers les grandes longueurs d'onde, on rencontre des rayonnements de moins en moins efficaces.

La légère différence constatée en faveur de l'écran vert sur l'écran jaune serin n'est pas une exception à cette règle, car le premier transmet deux fois moins de lumière que le second.

2^o *Sensibilité des différentes races de bactériophage.* — Nous avions déjà étudié la sensibilité à la lumière de deux bactériophages du bacille dysentérique Flexner : le S₁₃ et le C₁₆. Le premier, de petite taille (20 $\mu\mu$), s'était montré beaucoup plus sensible que le second, qui est un grand bactériophage (75 $\mu\mu$).

Mais en exposant, cette fois, d'autres bactériophages à la lumière solaire, nous avons constaté qu'il n'existe pas de relation générale entre la taille des bactériophages et leur sensibilité à la lumière.

En effet, des 5 bactériophages étudiés ensemble cette fois-ci, 2 se sont montrés très sensibles, ce sont le plus petit (S₁₃) et le plus grand (*Bacillus subtilis*).

Les 3 autres dont les dimensions s'échelonnent entre les deux premiers sont peu sensibles et le sont à peu près au même degré comme le montre le tableau suivant, indiquant le pourcentage du titre initial restant au bout de une demi-heure, deux heures et six heures d'exposition à la lumière :

	S ₁₃ p. 100	STREPTO B 563 p. 100	COLI 36 p. 100	C ₁₆ p. 100	SUBTILIS p. 100
1/2 heure.	30	60	65	80	25
2 heures.	2	50	52	60	6
6 heures	0	34	57	36	4

L'action de la lumière n'est donc pas comparable à celles des rayons X, des rayons ultra-violets, ou de la chaleur. Celles-ci sont liées de façon certaine à la taille des bactériophages. La lumière favorise vraisemblablement une réaction chimique, peut-être une oxydation.

C'est donc la constitution chimique des bactériophages qui semble devoir être la clef de leurs réactions vis-à-vis de la lumière.

(*Institut Pasteur. Service du Bactériophage.*)

ACTION DU SUBLIMÉ SUR LES BACTÉRIOPHAGES

par R. WAHL (*).

L'étude systématique de l'action des antiseptiques sur les divers bactériophages est encore à faire.

Il est certain qu'on doit en attendre des indications d'un grand intérêt sur la constitution. En ce qui concerne le sublimé, les recherches anciennes de Watanabe ne permettent pas de conclusion nette.

Au cours d'un travail précédent, où nous étudions deux bactériophages (celui du *B. subtilis* et celui du staphylocoque Twort) nous constatons que leur sensibilité était très différente. Nous avons cette fois étendu cette étude comparative à 6 bactériophages.

Deux méthodes sont *a priori* possibles : on peut rechercher la dose minima active de sublimé pour chacun ou comparer l'effet produit par une dose donnée dans des temps déterminés. Nous avons choisi la seconde, n'ayant pas pu jusqu'ici obtenir avec la première de résultats réguliers.

Nous avons utilisé des suspensions de bactériophage en eau physiologique de titre 10^{-3} à 10^{-4} , de façon à pouvoir compter facilement le nombre de plages donné par une goutte de suspension. Elles étaient obtenues par dilution de lysats bactériophagiques de titre très élevé (10^{-9} environ) pour éviter la présence de bouillon, qui, comme nous l'avions constaté précédemment, modifie la marche de l'inactivation par le sublimé.

Toutes les expériences étaient faites sur la même quantité totale

(*) Séance du 4 juin 1942.

(10 c. c.), à la même température (20°) et étaient accompagnées d'un témoin.

Des précautions étaient prises pour éliminer, autant que possible, les autres actions sur le bactériophage, en particulier celle de la lumière.

Chaque titrage était fait en double, chaque expérience fut répétée plusieurs fois. Les résultats donnés sont des moyennes.

Pour étudier la marche de l'inactivation, nous l'avons suivie chaque fois pendant six heures, en titrant le bactériophage au départ, puis au bout d'une demi-heure, de deux heures et de six heures.

Il fallait donc, pour chaque bactériophage, choisir, au préalable, une dose de sublimé qui ne le détruirait ni trop vite, ni trop lentement, de façon à pouvoir suivre l'inactivation pendant le temps choisi.

Ces expériences préalables nous ont permis de classer les bactériophages étudiés en 2 groupes, dont la sensibilité au sublimé est absolument différente. Nous avons ensuite, à l'intérieur de chaque groupe, trouvé des différences plus légères.

Premier groupe : bactériophages peu sensibles au sublimé. — Ce sont ceux du *B. subtilis* et *C₁₆*, auxquels il faut ajouter celui du staphylocoque Twort, étudié dans notre précédent travail. Une concentration de sublimé de l'ordre de 1 p. 10.000 n'inactive pas plus de 1/4 ou de 1/3 des bactériophages en six heures.

Pourcentage restant après l'action de 1 p. 10.000 de sublimé :

	SUBTILIS p. 100	C ₁₆ p. 100
1/2 heure	—	—
2 heures	90	95
6 heures	80	95
	57	75

Le bactériophage du staphylocoque Twort est nettement plus sensible que ces deux bactériophages.

Deuxième groupe : bactériophages très sensibles au sublimé. — Ce sont ceux du *B. coli* 36, du streptocoque *B. 563* et le *S₁₃*. Une concentration de 0,5 p. 100.000 de sublimé inactive la totalité ou presque en six heures, parfois même en moins de temps.

Pourcentage restant après l'action de 0,5 p. 100.000 de sublimé :

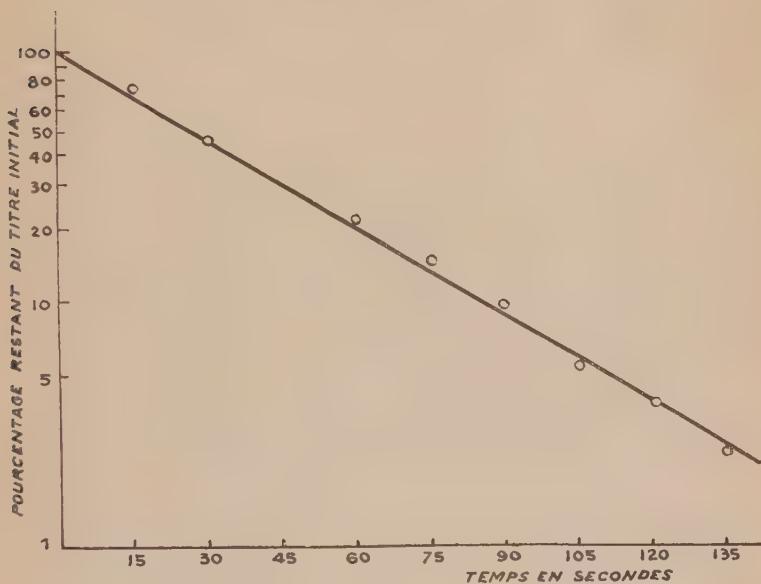
	COLI 36 p. 100	S ₁₃ p. 100	STREPTO p. 100
1/2 heure	—	—	—
2 heures	70	51	0
6 heures	7	4	0
	3	0	0

Courbe de destruction : la courbe de destruction est une courbe logarithmique (fig.). Krueger et Baldwin avaient trouvé au début de la courbe des irrégularités dues à ce qu'ils faisaient leurs expériences en bouillon. En eau physiologique, elles disparaissent. Notre courbe est obtenue avec le bactériophage *S₁₃*.

Rapport entre la taille des bactériophages et leur sensibilité au

sublimé. — On est frappé par le fait que le premier groupe comprend des bactériophages de grande taille (entre 60 $\mu\mu$ pour le bactériophage du staphylocoque Twort et 80 pour celui du *Subtilis*) ; alors que ceux du deuxième groupe sont de « petits bactériophages » : 12 $\mu\mu$ (*S₁₃*), 20 $\mu\mu$ (streptocoque), 25 $\mu\mu$ (coli 36).

Dans l'ensemble, les grands bactériophages sont donc beaucoup plus



Curbe de destruction du phage *S₁₃* par le sublimé
(coordonnées semi-logarithmiques).

résistants ; mais à l'intérieur de chaque groupe, l'influence de la taille n'apparaît plus.

Le bactériophage du *B. subtilis*, un peu plus grand que le *C₁₆*, paraît cependant un peu plus sensible que lui, et surtout le bactériophage du streptocoque *B. 563*, plus grand que le *S₁₃*, est beaucoup plus sensible que lui.

Il ne semble donc pas que le sublimé agisse uniquement en fonction de la taille, comme les rayons X. On pourrait plutôt chercher une explication du côté d'une constitution chimique différente dans chacun des deux groupes.

(Institut Pasteur. Service du Bactériophage.)

**RELATIONS ENTRE LA LYSE BACTÉRIOPHAGIQUE
ET LA MULTIPLICATION MICROBIENNE
ÉTUDIÉES A L'AIDE DES SULFAMIDES (1162 F.)**

par R. WAHL, F. NITTI et M. FAGUET (*).

Il est admis par la majorité des auteurs que le bactériophage ne se reproduit et ne lyse le germe sensible qu'en présence d'une culture de celui-ci en cours de multiplication.

Cette opinion s'appuie notamment sur les faits suivants : La bactériophagie n'atteint que les germes vivants (d'Hérelle). Elle ne se produit pas en eau physiologique, mais seulement en milieu nutritif [Bordet et Ciucă (1)]. On ne l'observe pas dans des conditions de température telles que le germe ne peut pas se multiplier : soit à la glacière [Gildemeister (2)], soit pour le bacille de Shiga à 46° [Wollman (3)].

Seuls quelques expérimentateurs, en particulier Krueger (4) et ses collaborateurs, pensent avoir observé une augmentation de titre d'un bactériophage sans multiplication du germe sensible.

Il nous a paru intéressant de reprendre cette étude en utilisant l'action bactériostatique des sulfamides, action élective sur la division cellulaire, qui permet d'expérimenter sans modifier par ailleurs les conditions de température et de milieu. De plus, nous possédons avec l'acide *p*-aminobenzoïque le moyen de neutraliser l'action du sulfamide.

Nous avons utilisé 2 bactériophages différents, les faisant agir chacun sur un germe approprié (se lysant totalement dans le milieu de culture utilisé) : le bactériophage C₁₆ agissant sur le bacille dysentérique Flexner (souche Y 6R), un bactériophage du *Proteus* agissant sur le *B. Proteus* Zencker (souche de l'Institut Pasteur).

Les cultures sont pratiquées dans un milieu synthétique dont nous avons précédemment donné la formule (5) et enregistré par le microbiophotomètre automatique à six directions de Faguet et Nitti (6). Cet appareil contient 6 cuves à faces planes contenant 50 c. c. de milieu et continuellement brassées par un courant d'air. Les ensements sont pratiqués avec des cultures en milieu synthétique âgées de dix-huit à vingt-quatre heures.

Les numérasions des germes microbiens étaient exécutées au photomètre de Meunier, étalonné au moyen d'une cellule compte-microbes de Glynn. Les titres de bactériophages étaient donnés par la méthode

(*) Séance du 6 janvier 1944.

(1) *C. R. Soc. Biol.*, 1920, 83, 1296.

(2) *Zentralbl. f. Bakter.*, 1922, 89, 181.

(3) *Ces Annales*, 1925, 789.

(4) *Journ. Phys.*, 1937-1938, 137.

(5) LWOFF, NITTI et TRÉFOUËL (Mme), *ces Annales*, 1941, 67, 173.

(6) FAGUET et NITTI, *ces Annales*, 1943, 69, 126.

de numération des plages. Une série d'expériences préalables avaient été faites :

1^o Pour s'assurer que les sulfamides, dans les conditions des expériences, n'altéraient pas les bactériophages.

2^o Pour fixer les quantités respectives des germes et du sulfamide nécessaire pour obtenir l'arrêt absolu de la croissance, se traduisant sur la courbe par un plateau.

Dans une première expérience, nous avons tout d'abord examiné par la méthode de l'enregistrement continu le phénomène de la bactériophagie (fig. 1). Nous avons ajouté à des moments différents de la phase logarithmique des croissances microbiennes une quantité fixe

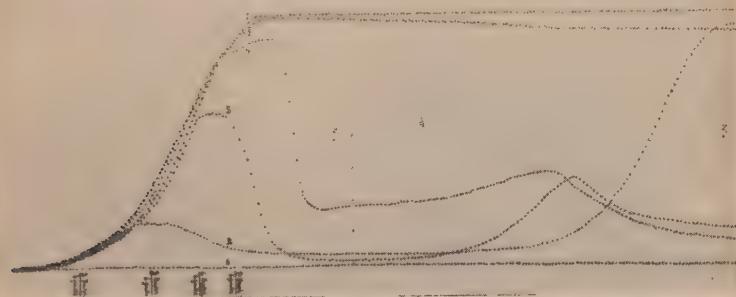


FIG. 1. — Les six cuves contenant 50 c.c. de milieu de culture sont placées à 37° dans le microbiophotomètre. La cuve n° 1 sert de témoin de croissance normale. La deuxième est additionnée de bactériophage pendant la fin de la phase logarithmique : la lyse est très faible. Les cuves 3, 4, 5 reçoivent du bactériophage à des moments différents de la courbe et la lyse se produit normalement. La cuve n° 6 contient du milieu de culture non ensemencé qui nous servira de témoin de stabilité de l'appareil. (Flexner Y6R et bactériophage C₁₆.)

de bactériophages. Nous avons observé que la lyse se produit à toutes les phases de la multiplication bactérienne.

Dans un deuxième essai, nous avons introduit dans le milieu du p-aminophénylsulfamide. Le stade de plateau correspondant à l'arrêt de la division microbienne étant atteint, nous avons ajouté dans une des cuves de l'acide p-aminobenzoïque et la division a repris très rapidement. Dans une autre cuve, l'addition simultanée d'acide p-aminobenzoïque et de bactériophage est suivie d'une rapide reprise de la division microbienne, puis la lyse survient (fig. 2 et 3).

L'adjonction de bactériophage seul après qu'une dose suffisante de sulfamide a complètement arrêté la croissance microbienne ne provoque pas de lyse.

Dans un troisième essai finalement, nous avons introduit dans les cuves les quantités de sulfamide insuffisantes pour arrêter complètement la division microbienne, mais provoquant néanmoins un ralenti-

tissement très net de la culture vis-à-vis des témoins non sulfamidés. Dans ces conditions, l'adjonction d'un excès d'acide p-aminobenzoïque amène une brusque accélération de la division microbienne, celle d'un mélange d'acide p-aminobenzoïque et de bactériophage, une accélération des divisions, puis une lyse. L'adjonction de bactériophage seul



FIG. 2. — La cuve 1 contenant du milieu sert de témoin de croissance normale. Les cuves 2, 3, 4 et 5 sont additionnées de 80 mg. de *p*-aminophénylsulfamide dans 50 c. c. de milieu. La cuve 6 ne contenant que du milieu non ensemencé sert de témoin de stabilité de l'appareil.

La phase de plateau correspondant à l'arrêt de division microbienne sous l'influence du sulfamide étant atteinte, on ajoute à la cuve 2,5 mg. de sel sodique de l'acide *p*-aminobenzoïque. La division reprend normalement. La cuve 3 reçoit 5 mg. de sel sodique de l'acide *p*-aminobenzoïque et du bactériophage. Après la reprise de la division microbienne la lyse apparaît. La cuve 4 est additionnée de bactériophage : la lyse fait défaut. La cuve ne contenant que du sulfamide dilué dans le milieu de culture montre que les divisions microbiennes sont arrêtées pendant l'expérience. (Flexner Y6R et bactériophage C₁₆.)

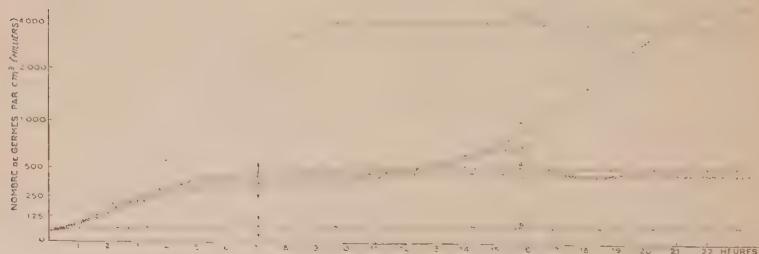


FIG. 3. — Même expérience que dans la figure 2. (*Proteus zenkeri* et bactériophage.)

est suivie d'une lyse partielle, ce dernier phénomène s'expliquant facilement par le fait qu'un certain nombre de germes se divisaient encore normalement (fig. 4).

Notons que le bactériophage introduit dans des milieux sulfamidés où la culture avait atteint le stade de plateau ne se multiplie pas. Au contraire, son titre baisse notablement, probablement parce qu'il se fixe sur les corps microbiens.

L'action élective du *p*-aminophénylsulfamide sur la division micro-

bienne et l'activité antagoniste de l'acide p-aminobenzoïque nous permettent d'apporter une nouvelle preuve de la nécessité de la division microbienne dans le phénomène de la bactériophagie.

Nos résultats semblent pouvoir fournir quelques arguments sur la nature du bactériophage. Ils paraissent peu favorables en effet à l'hypothèse d'un parasite du microbe aussi bien qu'à celui d'une diastase à reproduction autocatalytique. Dans les deux cas en effet,

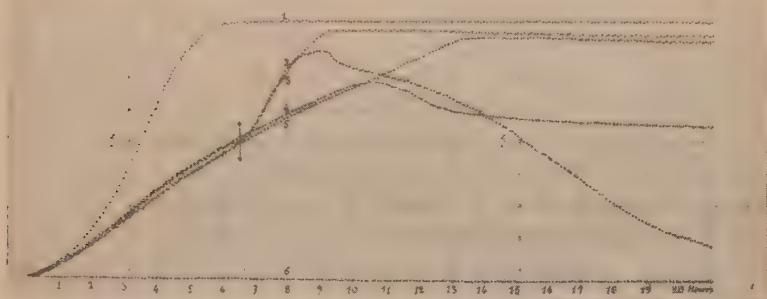


FIG. 4. — L'addition d'une faible quantité de sulfamide ralentit les divisions microbiennes sans les arrêter complètement. La cuve 1 sert de témoin de croissance normale et les cuves 2, 3, 4 et 5 sont additionnées de sulfamide et les divisions cellulaires sont fortement ralenties. Après six heures trente de culture, on ajoute dans la cuve 2 de l'acide *p*-aminobenzoïque et la division normale reprend aussitôt. Dans la cuve 3, de l'acide *p*-aminobenzoïque et du bactériophage : la multiplication reprend et la lyse apparaît. La cuve 4 contient du milieu sulfamidé : la culture continue à croître au ralenti. La cuve 5 additionnée de bactériophage est le siège d'une lyse partielle. (Flexner Y6R et bactériophage C₁₆.)

on ne voit pas comment la multiplication du germe serait nécessaire à la bactériophagie.

Par contre, elle s'accorde bien avec la conception de Wollman (autolyse hérédo-contagieuse), d'après laquelle le bactériophage agissant à la façon d'un gène ne se reproduit qu'en fonction de la division cellulaire.

(Institut Pasteur. Service du Bactériophage.)

Séance du 7 décembre 1944.

COMMUNICATIONS (SUITE ET FIN)

TRAITEMENT DU SODOKU EXPÉRIMENTAL DU COBAYE
PAR DE FAIBLES DOSES DE PÉNICILLINE

par F. NITTI, M. CONGE, M^{me} G. KAUFFMANN.

Dans des communications antérieures (1) (2), nous avons montré que les sulfamides avaient une action curative très nette sur le sodoku expérimental du cobaye. Il nous a paru intéressant de rechercher l'action de la Pénicilline sur cette maladie.

Le manque actuel d'animaux et l'impossibilité de se procurer des quantités suffisantes de ce médicament ne nous ont pas permis d'étudier systématiquement cette thérapeutique. Néanmoins, les premiers résultats obtenus avec de très faibles doses nous ont paru mériter une note préliminaire.

Quatre expériences ont été faites avec des doses allant de 600 à 1.000 unités par kilogramme et par jour, et bien que ces doses soient environ 400 fois inférieures à celles utilisées par Eagle, Magnuson et Munckman pour obtenir 95 p. 100 de guérisons dans le traitement des infections récurrentes du rat et de la souris, nous avons pu constater une réaction très nette du sodoku à cette thérapeutique. Dans chaque expérience et sur tous les animaux traités, nous avons constaté la disparition des spirilles dans le sang et chez certains animaux, l'arrêt de l'amaigrissement. Puis au bout d'un temps variant entre quatre et trente jours, et nettement en rapport avec la dose quotidienne administrée et la durée du traitement, on constate la reprise du cours de la maladie ; les spirilles réapparaissent dans le sang, la courbe pondérale s'infléchit et les animaux succombent.

Ainsi ces doses sont insuffisantes et ne permettent pas de juguler une infection toujours mortelle pour les témoins, mais elles arrêtent pendant un certain temps le processus infectieux et retardent nettement la mort.

La disparition des spirilles dans le sang, si elle n'est pas un test de guérison, ainsi que nous l'avons défini dans une note précédente (2),

(1) F. NITTI, F. BOYER, M. CONGE, ces *Annales*, 1942, **68**, 497.

(2) M. CONGE, F. BOYER, ces *Annales*, 1944, **70**, 119.

n'en reste pas moins un phénomène digne de mention, si l'on veut bien se souvenir que chez le cobaye témoin, les spirilles qui apparaissent dans la circulation vers la fin du deuxième septénaire de la maladie, y sont ensuite toujours visibles, jusqu'à la mort de l'animal.

Il est permis d'espérer qu'avec des doses plus fortes de Pénicilline, (doses d'ailleurs plus en rapport avec celles utilisées en thérapeutique humaine pour le traitement de septicémies diverses) on puisse obtenir un certain pourcentage de guérisons, si ce n'est même la guérison de la presque totalité des animaux traités.

ACTION DU PARA-AMINOPHÉNÝLSULFAMIDE (1162 F) SUR LE DÉPART DES CULTURES D'ENTAMŒBA-DYSENTERIÆ

(DEUXIÈME NOTE)

par L. LAMY.

Nous avons montré dans une note précédente (1) que le para-aminophénylsulfamide favorise d'une manière très appréciable la culture d'*E. dysenteriæ* et qu'il, permet d'espacer les repiquages d'un temps très important. Nous allons, dans cette note, donner nos résultats concernant l'action du 1162 F sur le départ des cultures initiales à partir des kystes ou des formes végétatives contenues dans les selles.

Le départ des cultures d'*E. dysenteriæ* sur milieu de Dobell modifié : (Partie solide : Sérum de cheval coagulé ; partie liquide : Ringer Sérum, Substance figurée : Amidon de riz), à partir d'un fragment de selle contenant des kystes est une chose assez délicate et ce départ paraît être fonction de facteurs d'ailleurs assez mal définis. En particulier, il semble que certaines flores soient défavorables à la culture d'*E. dysenteriæ* et empêchent, de ce fait, le démarrage des cultures. Il est nécessaire que les kystes soient lavés et débarrassés de la plus grande partie possible des débris fécaux ; il faut ensuite faire une concentration des kystes, tout en employant une méthode qui ne les altère pas. C'est ainsi que Yorke et Adams ont donné une méthode très longue et très compliquée ; Bidegaray l'a simplifiée, mais, néanmoins, elle comporte plusieurs centrifugations, une suspension dans un sirop de sucre de canne et plusieurs lavages.

Nous avons essayé de faire démarrer des cultures d'*E. dysenteriæ* en partant d'une selle contenant de nombreux kystes à 4 noyaux ainsi que des kystes de *Giardia*. Nous avonsensemencé directement sur deux séries de milieux, un petit fragment de selle, sans aucune préparation préalable, ce qui est un avantage de l'emploi du milieu sulfamidé : 1^o) sur milieu de Dobell modifié défini ci-dessus ; 2^o) sur le même

(1) Ces Annales, 1944, 70, 318.

milieu mais dont la partie liquide était non pas du Ringer Sérum pur, mais une solution sulfamidée de Ringer Sérum au 1 1.000°, au 1/500° ou au 1/200°.

Voici les résultats des essais faits à partir de cette selle particulière :
 1°) Tous les milieux ordinaires ensemencés ont donné une culture négative avec flore bactérienne très riche et probablement défavorable ;
 2°) Tous les milieux sulfamidés du 1 1.000° au 1/200° ont donné une culture positive. Partout les formes amibiennes végétatives étaient très belles, très mobiles, mais néanmoins leur nombre allait diminuant, nombreuses dans la solution au 1/1.000°, elles étaient beaucoup plus rares dans la solution au 1/200°.

A noter que nous avons constaté ce résultat quatre jours après l'ensemencement, les contrôles faits les premier et troisième jours après l'ensemencement ne nous ont pas montré d'amibes, mais ceci ne doit pas nous étonner car la culture sur milieu sulfamidé est toujours plus longue à démarrer, ce qui d'ailleurs est un avantage ; en effet, ceci évite le repiquage journalier nécessaire en milieu normal pour la bonne marche d'une culture nouvelle.

Un premier repiquage fait sept jours seulement après l'ensemencement a donné une subculture positive. Dix jours après l'ensemencement les cultures sulfamidées initiales montraient encore des formes vivantes.

3°) On sait que l'addition d'amidon de riz au milieu de Dobell, préconisée par E. Brumpt, outre qu'elle apporte aux amibes un facteur nutritif très favorable, entrave aussi le développement des *Blastocystis* très fréquents chez l'Homme et caractéristiques des selles de colite. D'une manière générale, en présence d'amidon de riz, les *Blastocystis* au lieu d'envahir la culture, finissent par disparaître au bout de quelques repiquages. Or, alors que les *Blastocystis* étaient très nombreux dans le tube de départ, sur milieu normal, on n'en trouvait pratiquement plus dans les milieux sulfamidés quatre jours après l'ensemencement et dès le premier repiquage, ils avaient disparu. Le sulfamide ajoute donc son action à celle de l'amidon de riz.

En résumé, le 1162 F, en freinant le développement bactérien, permet un démarrage beaucoup plus sûr des cultures d'*E. dysenteriae* évite les premiers repiquages journaliers et enfin entrave le développement des *Blastocystis* en associant son action à celle de l'amidon de riz.

Ces résultats sont à mettre en parallèle avec ceux que nous avons obtenus dans le cycle complet d'*E. dysenteriae* en culture (2). Ils sont à rapprocher aussi de certains résultats obtenus récemment par les auteurs américains, en étudiant l'action de la flore bactérienne sur les cultures d'*E. histolytica* (3).

(Institut Pasteur. Groupe des Services de Parasitologie.)

(2) R. DESCHIENS et L. LAMY, *C. R. Soc. Biol.*, 1944, **138**, 949.

(3) B. D. CHINN, L. JACOBS, L. REARDON et C. W. REES, *Amer. J. trop. Med.*, 1942, **22**, 137. — E. C. RODANICHE et J. B. KIRSNER, *J. Parasitology*, 1942, **28**, 441.

Nous n'avons pas le détail de ces travaux, qui ne nous sont connus que par des analyses du *Tropical Diseases Bulletin*.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoires* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

L'inhibition de la diapédèse par les endotoxines bactériennes et son mécanisme, par A. DELAUNAY et J. PAGES.

1^o) Propriétés et composition de la toxine du *Bacillus perfringens*. I. Action hémolytique ; II. Action léthale. Effet nécrosant. — 2^o) Propriétés comparées des toxines élaborées par les différents types de *B. perfringens*. I. Etat actuel de la question, par M. GUILLAUMIE, A. KREGUER et M. FABRE.

Influence de la composition du milieu sur la bactériophagie. I. Rôle du calcium. II. Rôle de l'aneurine, par R. WAHL.

Etude histochimique des lésions dues aux ultraviruses. I. Acides nucléiques, par P. LÉPINE et V. SAUTTER.

Séance du 4 janvier 1945.

Présidence de M. NÉGRE.

COMMUNICATIONS

POSITION DE *HAVERHILLIA MONILIFORMIS* (L. N. P.) NOUV. COMB. DANS LA SYSTÉMATIQUE BACTÉRIENNE

par A. R. PRÉVOT.

En 1925, C. Levaditi, S. Nicolau et P. Poincloux [1] ont isolé, figuré et décrit l'agent d'un cas d'érythème polymorphe aigu après morsure de souris, sous le nom de *Streptobacillus moniliformis*, dénomination qui avait l'avantage de ne pas préjuger de la position systématique de ce germe intéressant, puisque le terme *Streptobacillus* n'est pas défini et ne correspond pas à un genre précis. Par contre, en tant qu'espèce bien individualisée, ce germe doit conserver le nom spécifique *moniliformis* du fait de la priorité incontestable de ce terme. En 1926, Place, Sutton et Willner [2] ont isolé le même microbe dans une épidémie d'érythème aigu avec arthrite ayant reçu le nom de fièvre d'Haverhill (Massachusetts). La même année, Parker et Hudson [3] étudient ce même germe et, ignorant le travail de

Levaditi, Nicolau et Poincloux, l'appellent *Haverhillia nulliformis*, définissant le nouveau genre *Haverhillia* par ses caractères morphologiques (bâtonnets Gram-négatifs, filaments, tendance aux ramifications, formes irrégulières, renflées, immobilité) et un caractère physiologique (besoin de protéines complexes). Ils rangent ce nouveau genre dans la famille des *Mycobacteriaceæ* Chester, ordre des Actinomycetales Buchanan. Ils font néanmoins des réserves sur cette classification en raison du caractère Gram-négatif, de l'absence de granulations et de formes rayonnées, enfin de la non-acido-résistance.

Mackie, Van Rooyen et Gilroy, 1933 [4], l'ayant retrouvé dans une épidémie sévissant dans un élevage de souris, se refusent à le classer, mais le rapprochent d'*H. influenzae* à cause du besoin de sérum. Stuart-Harris, Wells et Rosher, 1935 [5], l'ont isolé d'une endocardite infectieuse et pensent, comme Parker et Hudson, qu'il s'agit d'un actinomycète. En 1936, Van Rooyen [6], ayant repris l'étude des souches isolées précédemment avec Mackie et Gilroy, les identifie à *Haverhillia multififormis* P. et H. et les rapproche de *B. piliformis* isolé par Tizer en 1917-18 [7] d'une épidémie mortelle survenue parmi les élevages de souris valseuses japonaises. Notons en passant que les formes renflées que Tizer a prises pour des spores subterminales sont probablement les formes renflées mais non sporulées de ce germe polymorphe. Se fondant uniquement sur des caractères physiologiques, Van Rooyen le classe parmi les *Hemophilæ* (besoin de facteurs X et V).

En 1937, Lemierre, Reilly, Laporte et Morin [8] ont isolé le même germe d'un cas de pseudorhumatisme infectieux avec érythème cutané survenu après morsure de rat. Dans ce très intéressant travail, comportant une étude bibliographique très complète, ces auteurs rapprochent leur germe de *Streptothrix ratti* Schootmüller [syn. : *Streptothrix muris-ratti* Dick et Tunnicliff ; *Actinomyces muris-ratti* (Sch.) Lieske]. Mais le problème de l'identité des deux germes est insoluble du fait que la souche de Schottmüller est disparue et que la notion de pluralité des espèces exige une confrontation expérimentale des souches pour pouvoir en affirmer l'individualité.

En 1939, Dienes [9] a identifié à des variétés de *Streptobacillus moniliformis* les « L. organisms » de Klieneberger, mais ne fait aucune tentative de classification. La même année, Farell, Lordi et Vogel ont isolé [10] le même germe d'un cas d'érythème polymorphe infectieux après morsure de rat et l'identifient à *Streptobacillus moniliformis* (L.N.P.) = *Haverhillia multififormis* P. et H. et ont bien noté les formes filamenteuses, polymorphes, fusiformes. Le même germe a encore été trouvé par Allbritton, Shelly et Jeffers, en 1940 [11], dans une septicémie après morsure de rat ; par Pallazzà et Della Picca [12], en Argentine, dans une épidémie chez des souris ; en 1941, par Peltier, Arquié, Durieux et Jonchère [13], en Afrique, après septicémie mortelle due à la morsure du rat palmiste, et enfin, en 1942, par Orskov [14], au Danemark, ce qui a permis à ce dernier auteur de noter, point capital, la formation de sphéroïdes dans les colonies sur milieu solide ; il le rapproche de plus du microbe de la péripneumonie (sans toutefois lui avoir trouvé de formes filtrables).

Il s'agit donc d'un germe important, très pathogène, d'extension universelle, dont le réservoir est la souris, le rat, le rat palmiste et

probablement d'autres rongeurs, et il est étonnant que la dernière édition du *Bergey's Manual* évite de le classer, se bornant à le citer en appendice aux *Bacteriaceæ*, en le distinguant de *B. piliformis* Tyzzer.

Or, il est bien évident qu'il ne s'agit nullement d'une Eubactériale, puisque nous trouvons dans la morphologie de ce germe, magnifiquement figurée dès le premier travail de Levaditi, Nicolau et Poincloux et dans les publications ultérieures de tous les auteurs, des éléments de différenciation qui permettent de l'affirmer : formes filamenteuses avec tendance à la ramifications, surtout formes en Y, formes renflées précoces, formes fusiformes et surtout sphéroïdes. Les auteurs qui ont cru pouvoir le rapprocher des *Hemophilea* ont commis une erreur de principe ; la communauté du besoin de facteurs X et V avec les *Hemophilea* ne suffit pas à le classer parmi ces organismes puisque la morphologie en est nettement différente.

N'étant pas une Eubactériale, puisque présentant des éléments différenciés, cette espèce ne peut être classée que parmi les Actinomycétales, dont elle présente tous les caractères. Le nouvel arrangement de cette classe bactérienne, proposé en 1938 [15], pour pouvoir admettre logiquement les formes Gram-négatives anaérobies, permet de la situer aisément. En effet, si on compare la morphologie des espèces du genre *Spherophorus*, type de la famille des *Spherophoraceæ* et dont l'espèce-type est *Spherophorus funduliformis*, on constate facilement une parenté très étroite, frisant presque l'identité. Il ne manque guère du côté d'*Haverhillia moniliformis* que les formes en navette ; toutefois, il est sage de conserver provisoirement le terme d'*Haverhillia* bien défini par Parker et Hudson et de le situer tout près de *Spherophorus*, dont il paraît être un sous-genre physiologique dont les caractères différentiels sont : anaérobiose facultative et besoin de facteurs X et V.

En résumé, le microbe des septicémies d'allure érythème polymorphe après morsure de rongeur doit être appelé :

Haverhillia moniliformis (L. N. et P.) nouv. comb. et être classé dans le sous-genre *Haverhillia* à côté du genre *Spherophorus*, famille des *Spherophoraceæ*, ordre des *Actinobactériales*, classe des *Actinomycétales*.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] LEVADITI, NICOLAU et POINCOUX. *C. R. Acad. Sci.*, 1925, **180**, 1188 et *Presse Méd.*, 1926, no 22.
- [2] PLACE, SUTTON et WILLNER. *Boston Med. Surg. J.*, 1926, **194**, 285.
- [3] PARKER et HUDSON. *Am. J. Path.*, 1926, **11**, 357.
- [4] MACKIE, VAN ROOYEN et GILROY. *Brit. J. exp. Path.*, 1933, **14**, 132.
- [5] STUART-HARRIS, WELLS et ROSHER. *J. Path. a. Bact.*, 1935, **41**, 407.
- [6] VAN ROOYEN. *J. Path. a. Bact.*, 1936, **43**, 455.
- [7] TYZZER. *J. Med. Res.*, 1917-1918, **37**, 307.
- [8] LEMIERRE, REILLY, LAPORTE et MORIN. *Bull. Acad. Méd.*, 1937, **117**, 705.
- [9] DIENES. *J. inf. Dis.*, 1939, **65**, 24.
- [10] FARELL, LORDI et VOGL. *Arch. internat. Med.*, 1939, **64**, 1.
- [11] ALLBRITTON, SHELLY et JEFFERS. *J. Am. Med. Assoc.*, 1940, **114**, 2360.
- [12] PALLAZZA et DELLA PICCA. *Rev. Sud-Amér.*, 1940, **3**, 139.

[13] PELTIER, ARQUIÉ, DURIEUX et JONCHÈRE. *Bull. Acad. Méd.*, 1941, **425**, 96.
 [14] ORSKOV. *Acta Path. et Microb. Scand.*, 1942, **49**, 575.
 [15] PRÉVOT. *Ces Annales*, 1938, **60**, 280.

Au sujet des problèmes soulevés par ce travail, je voudrais formuler devant notre Société un vœu qui a été souvent exprimé par de nombreux bactériologistes avant moi et qui n'a jamais été réalisé parce qu'aucune Société de Bactériologie n'était qualifiée jusqu'ici pour le recevoir et le mener à bien. Maintenant que notre Société est vivante et active, ce vœu a chance d'être écouté et suivi :

1^o Toute espèce nouvelle doit être présentée avec une étude taxonomique complète : genre, famille, ordre et classe.

2^o Pour éviter la disparition des souches des espèces nouvellement décrites — ce qui engendre ultérieurement des difficultés insurmontables de comparaison avec les souches voisines ou identiques, — les bactériologistes sont instamment priés d'en déposer un exemplaire à la *Collection Nationale de bactéries* qui va être créée en France ; ces souches seront à la disposition des systématiciens, des bactériologistes et des biochimistes de toutes les nations afin que la description complète des caractères puisse être faite et la place dans la systématique fixée.

LA FLAVINOGÉNÈSE
PAR *EREMOTHECIUM ASHBYII*, GUILLIERMOND
ÉTUDE DU FACTEUR SURFACE/VOLUME

par G. ARRAGON, J. MAINIL, R. REFAIT et H. VELU.

Plusieurs travaux récents viennent d'attirer à nouveau l'attention sur la flavinogénèse d'*Eremothecium Ashbyii*, déjà étudiée par Guilliermond [1], Raffy et Fontaine [2], Raffy [3].

Renaud et Lachaud [4] ont mis au point un milieu très favorable à cette biosynthèse.

Dans son important mémoire, W. H. Schopfer [5] a cherché à préciser l'action de divers facteurs de croissance (vitamines pures ou sous forme d'extraits végétaux ou animaux) ajoutés dans un milieu synthétique impropre à la culture. Ce rôle est considérable, puisque l'addition d'asparagine et d'extrait de levure par exemple lui a permis d'obtenir des rendements de 600 γ pour 25 c. c. de milieu maltosé et de 800 γ en milieu glucosé, soit 24 et 32 mg. par litre.

Il ne faut cependant pas oublier le rôle des autres conditions culturelles qui président à l'élaboration de la riboflavine et dont l'importance est loin d'être négligeable, ainsi que l'ont montré Schopfer, puis Renaud et Lachaud, pour la concentration en glucides, la concentration ionique, l'action des peptones. Nous croyons même que ces conditions semblent primer pour le moment l'étude des facteurs de croissance.

Nous en avons déjà étudié une : la sélection des variétés les plus actives d'*Eremothecium Ashbyii* par dissociation de la souche d'origine [6].

Cette note en concerne une deuxième, le rapport surface/volume du milieu qui traduit probablement une relation capitale entre l'aération et la richesse du milieu.

Un premier essai réalisé avec une suspension très dense obtenue à

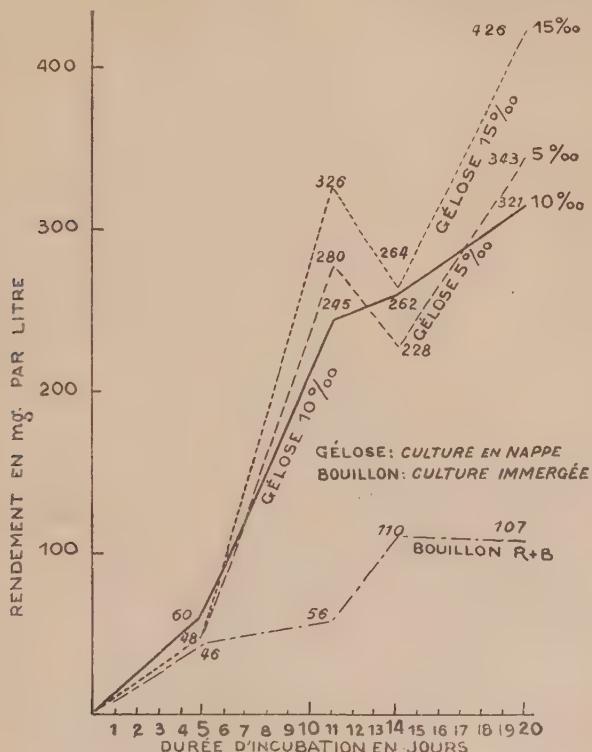


FIG. I.

partir des secteurs jaunes d'une colonie géante blanche,ensemencée à la pipette à raison de 2 à 3 c. c., en fioles de Roux de 1 litre, renfermant des volumes variables (100 à 175 c. c.) de milieu Renaud modifié, liquide ou gélosé, au taux de 5, 10 et 15 p. 1.000; nous avait montré que l'activité biochimique des cultures immersées en milieu liquide était de beaucoup inférieure à celle des nappes sur milieux solides ou semi-solides (environ 3 à 4 fois).

MILIEU liquide	MILIEUX GÉLOSÉS		
	5 p. 1.000	10 p. 1.000	15 p. 1.000
Vitamine B ₂ en milligrammes p. 1.000	107	343	321 à 360

La richesse en riboflavine des milieux solides et semi-solides est dans l'ensemble proportionnelle à la teneur en gélose (graphique I).

Le rendement optimum semble s'être situé aux environs du neuvième-dixième jour pour les nappes superficielles et du quinzième jour pour les cultures immergées ; cette incubation semble confirmée par la disparition — totale au onzième jour pour tous les milieux — du glucose déjà réduit au sixième jour de 20 g. par litre, à 4-5 g. par litre.

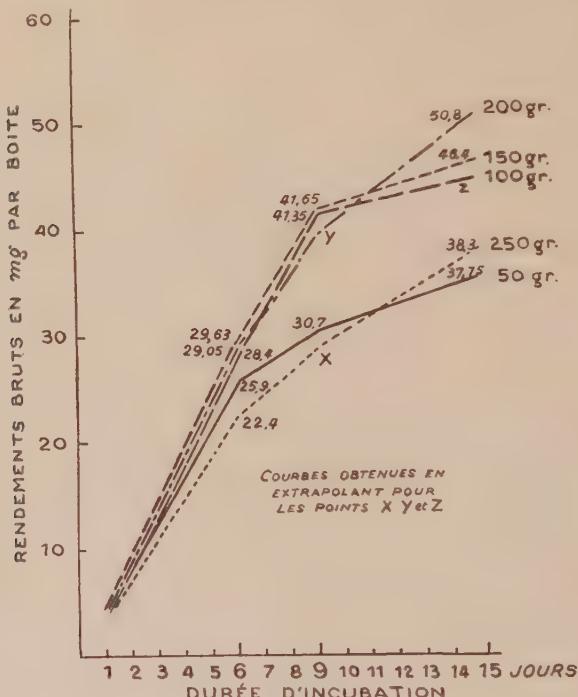


FIG. 2.

en milieu liquide, à 3-4 g. en gélose à 10 p. 1.000, à 1,5 g. en gélose à 15 p. 1.000.

GLUCOSE restant	MILIEU liquide	MILIEUX GÉLOSÉS		
		5 p. 1.000	10 p. 1.000	15 p. 1.000
Au 6 ^e jour. .	5 p. 1.000	4 p. 1.000	3,5 p. 1.000	1,5 p. 1.000
Au 11 ^e jour .	0	0	0	0

L'importance de la culture superficielle ainsi établie, nous avons déterminé celle de l'épaisseur du milieu ou mieux du rapport de sa surface en centimètres carrés à son volume en centimètres cubes par des essais ultérieurs effectués sur gélose à 25 p. 1.000 ou sur Carraghen à 50 p. 1.000, qui nous ont permis de faire les constatations suivantes :

1^o Les milieux très épais (à faible rapport S/V : 0,64 dans les fioles de 250 c. c. de milieu) favorisent le développement mycélien aux dépens de l'activité biochimique (avec 38,3 mg. de riboflavine par fiole et 152 mg. par litre de milieu).

2^o Les milieux très minces favorisent au contraire la biosynthèse aux dépens de la végétation : les fioles de 50 c. c. de milieu ont donné 35,75 mg. par fiole ou 715 mg. par litre avec un rapport S/V de 3,02.

3^o Il convient de faire remarquer que les fioles à plus fort rende-

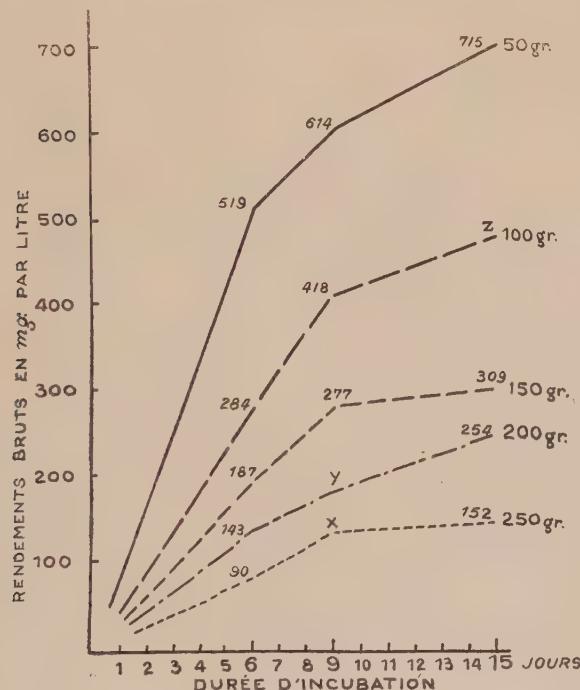


FIG. 3.

ment, non plus volumétrique mais unitaire, c'est-à-dire par fiole, sont celles qui renferment 100 à 200 g. de milieu (graphiques II et III), obtenus en extrapolant pour la valeur de x non mesurée, et en rectifiant les valeurs de y et z manifestement hors de la norme en raison du trop petit nombre de boîtes examinées. Le rapport S/V dans ces fioles est compris entre 1,6 et 0,8 et la teneur en riboflavine par boîte n'est plus que de 475 et 254 mg. par litre correspondant à 46,4 à 50,8 mg. par boîte.

4^o D'autre part, le rendement optimum qui traduit mieux encore l'intensité de la flavinogénèse se situe dans les boîtes de 100 à 200 g. vers 418 et 200 mg. par litre (graphique III) pour les cultures de neuf jours. Passé ce délai, l'augmentation entre le dixième et le quin-

zième jour n'est plus que de 10 p. 1.000 du taux de riboflavine produite.

Le « coefficient économique », rapport entre la quantité de matière vivante sèche produite et la dose de facteur vitaminique élaboré qui, d'après Schopfer donne une image frappante de l'intensité de la biosynthèse par les organismes auxo-autotrophes, doit donc être nécessairement exprimé en fonction du temps.

5° Il existe donc un manque de proportionnalité entre la riboflavine synthétisée et le mycélium produit, signalé également par Schopfer.

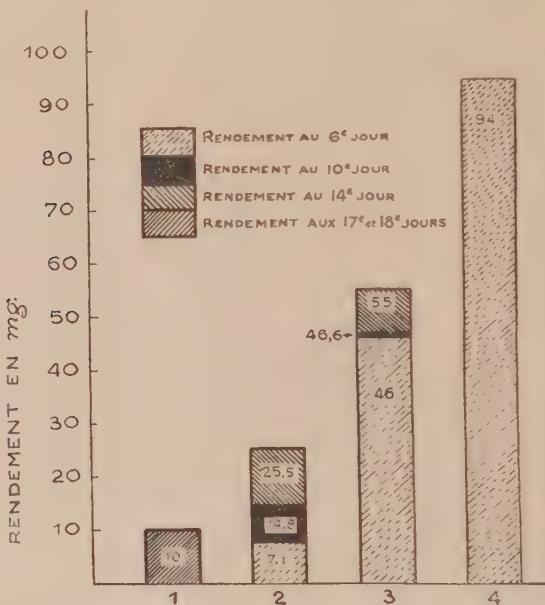


FIG. 4.

Nous croyons en avoir trouvé la cause dans la diffusion de la lactoflavine, hors du mycélium, dans le milieu, en fonction du temps. En dosant séparément la riboflavine dans le mycélium et dans le milieu, nous avons constaté que la quantité totale ne varie plus guère après le quinzième jour ; la quantité excrétée augmente et celle contenue dans le mycélium diminue. Le rapport de ces deux dernières traduit très clairement ces variations pour des cultures sur 200 c. c. de milieu en fioles de Roux de 1 litre.

Rappelons que le glucose est entièrement consommé et la culture pratiquement terminée entre le neuvième et le quinzième jour ; que la lactoflavine n'augmente plus guère après le quinzième jour et que le mycélium est en partie lysé au vingt-deuxième jour, surtout en milieu liquide, d'où le passage de la plus grande partie de la riboflavine dans le milieu.

B ² PAR FIOLE	5 JOURS	9 JOURS	15 JOURS	22 JOURS
	(mg.)	(mg.)	(mg.)	(mg.)
I. — <i>Cultures immergées.</i>				
a) Mycelium	4,8	11,4	4,0	4,2
b) Milieu	4,7	7,4	13	21
Total a + b	9,5	18,8	17	22,2
Rapport $\frac{a}{b}$	1	1,54	0,3	0,06
II. — <i>Cultures superficielles.</i>				
a) Mycelium	20,4	23	20	8,0
b) Milieu	43,3	20,3	50,8	63
Total a + b	33,7	43,3	70,8	73
Rapport $\frac{a}{b}$	1,53	1,1	0,39	0,12

Ainsi s'explique la « monstruosité physiologique » de Schopfer, la synthèse d'un poids de vitamine qui dépasse celui de la matière vivante.

En d'autres termes, la riboflavine, produit de biosynthèse, semble fonctionner, soit comme une substance de réserve, soit comme un produit d'élimination, avec prédominance de l'un ou l'autre type, suivant le stade de la végétation.

En résumé, la flavingénèse n'est pas seulement fonction de la sélection des souches d'*Eremothecium*, mais aussi des conditions culturelles. Les nappes superficielles constituent la base essentielle d'une active flavingénèse, liée, semble-t-il, à une large aérobiose, alors que l'immersion lui est nettement défavorable.

Les variations du taux de riboflavine, avec les modifications du rapport surface/volume du milieu, sont telles qu'il est impossible de ne pas en tenir compte dans toute étude sur la flavingénèse.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] GUILLERMOND, *C. R. Acad. Sci.*, 1935, **204**, 1077.
- [2] RAFFY et FONTAINE, *C. R. Acad. Sci.*, 1937, **205**, 1005.
- [3] RAFFY, *C. R. Acad. Sci.*, 1939, **209**, 900.
- [4] RENAUD et LACHAUD, *C. R. Acad. Sci.*, 1944, **219**, 498.
- [5] SCHOPFER, *Helvetica Chemica Acta*, 1944, **27**, 1017.
- [6] ARRAGON, MAINIL, REFAIT et VELU, *C. R. Acad. Sci.*, 1945, **220**, 65.

RECHERCHE D'ACIDE RIBONUCLÉIQUE DANS LES INCLUSIONS AMARILES

par LOUIS VAN DEN BERGHE.

Pour la plupart des maladies à virus de l'homme et des animaux, on a décrit des inclusions protoplasmiques et nucléaires dans les cellules qui sont le siège de l'infection. Il se peut que ces inclusions qui affectent généralement la forme de granulations soient les éléments mêmes du virus. Peut-être ne sont-elles au contraire que le résultat de l'infection et ne se rapportent-elles qu'indirectement au virus lui-même.

Il serait intéressant de préciser la relation qui unit les virus aux inclusions et notamment de rechercher s'il existe un rapprochement dans leur composition chimique (1). Nous savons que les unités infectantes de virus sont constituées par des molécules de nucléoprotéides. Plusieurs travaux ont démontré, suivant les virus étudiés, la présence d'acide thymonucléique ou ribonucléique. La recherche de ces deux acides s'impose donc dans les coupes histologiques qui révèlent des inclusions à virus.

La détection de l'acide thymonucléique se fait classiquement par la réaction histochimique de Feulgen, mais l'interprétation de celle-ci n'est pas aisée lorsqu'il s'agit de différencier la part qui revient à l'acide thymonucléique du noyau de celle qui proviendrait éventuellement d'inclusions nucléaires.

Pour l'acide ribonucléique, par contre, nous disposons d'une méthode très fidèle basée sur l'emploi de la ribonucléase, ferment extrait du pancréas de bœuf suivant la méthode de Dubos et Mac Leod (2). Les coupes histologiques sont déparaffinées et réparties en deux lots. Le premier, servant de témoin, est placé dans une solution physiologique tamponnée à un pH de 6,8, le second dans le liquide contenant la ribonucléase, ramené lui aussi au même pH. Le tout est maintenu pendant deux à trois heures à une température qui peut varier d'après les expériences de 40° à 70°. Les unes et les autres coupes sont ensuite colorées de la même façon, ce qui permet un contrôle rigoureux des images observées. Toute structure qui ne se colore pas après l'action de la ribonucléase est liée à l'existence d'acide ribonucléique et ses affinités tinctorielles dans la coupe témoin, non traitée par le ferment, dépendent de la présence de cet acide.

(1) Ces recherches ont été entreprises en 1942 et j'en avais entretenu M. Lépine à l'époque. Les résultats s'avérant négatifs, je n'avais pas estimé urgente leur publication. En 1944, de passage à Paris, j'ai appris de M. Lépine comment il avait depuis appliqué la même méthode à plusieurs inclusions de virus et obtenu les mêmes résultats négatifs (note présentée à la Société française de microbiologie, séance précédente). C'est ce qui me décide, d'accord avec lui, à publier ici-même les résultats de mes recherches.

(2) R. DUBOS et MACLEOD, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1937, 36, 696 ; *J. exp. Med.*, 1938, 67, 791.

En dépit de sa clarté d'interprétation, l'expérience de la méthode (3) incite cependant à ne l'appliquer, comme toutes les méthodes histo-chimiques d'ailleurs, qu'à des structures très nettes, clairement définies et bien dessinées. Aussi la présente étude se limite-t-elle à la recherche de l'acide ribonucléique dans les inclusions amariles du foie provenant d'un matériel spécialement favorable : celui d'un Cynocéphale, *Papio jubilæus*, mort d'hépatite à la suite d'une variation brusque et spontanée (mutation) du virus neurotrophe (« french strain » de Sellards au 322^e passage sur souris) en virus viscérotrope (4).

Le diagnostic d'hépatite amarile repose, outre la répartition particulière dite de da Rocha Lima des lésions lobulaires, sur l'existence d'inclusions protoplasmiques et nucléaires. Les premières, surtout classiques chez l'homme (corps réfringents éosinophiliques de Councilman), sont de contours trop mal définis que pour se prêter aisément aux méthodes histo-chimiques. Les secondes (grains éosinophiliques de Torrès) sont très fines, multiples et d'une lecture assez délicate, en particulier chez l'homme. On pourrait à dire vrai décrire actuellement trois images d'inclusions, liées semble-t-il à l'espèce animale :

1^o L'image classique du *Macacus rhesus* où les granulations de Torrès sont assez nombreuses et les corps de Councilman rares.

2^o L'image typique de l'homme où les grains de Torrès sont moins nombreux et moins caractéristiques, mais où les corps de Councilman dominent.

3^o L'image longuement décrite dans mes précédents travaux et indiscutablement liée à la mutation de virus amarile chez un Cynocéphale, où les corps de Councilman sont rares, mais où les inclusions nucléaires sont beaucoup plus grosses et plus délimitées que chez le *Macacus rhesus*. Inclusions sphériques, volumineuses, le plus souvent uniques ou doubles, parfois plus grosses que le nucléole et contrastant avec celui-ci par leur couleur rose vif.

Ces inclusions, les plus belles qui se puissent rencontrer, servirent seules dans la recherche d'acide ribonucléique. Celle-ci fut entièrement négative. Colorées à l'hémalun-éosine, les coupes traitées à la ribonucléase révélèrent des inclusions en tous points identiques à celles observées dans les coupes de contrôle.

A première vue d'ailleurs, la franche éosinophilie des inclusions ne laissait que peu de chance d'être compatible avec une présence quelque peu abondante d'acides nucléiques, ceux-ci possédant des affinités tinctoriales basophiles. Un complexe moléculaire acidophile compréhendant dans sa structure un acide nucléique était néanmoins possible.

En conclusion de ces recherches, nous pouvons établir nettement que les inclusions nucléaires amariles ne sont liées, ni par leur coloration, ni par leur structure, à l'existence d'acide ribonucléique.

(*Institut de Médecine Tropicale Prince Léopold, Anvers.*)

(3) L. VAN DEN BERGHE, *Acta Biol. Belg.* 1942, **2**, 390 et **4**, 464. — L. VAN DEN BERGHE et J. HOFFMANN, *Soc. de Biol. (sec. belge)*, séance d'octobre 1944.

(4) L. VAN DEN BERGHE, *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **131**, 153 ; *Rep. ad Intern. C. Microbiol.*, New-York, 1933 ; *Ann. Soc. Belge Med. Trop.*, 1940, **20**, 1.

**ACTION D'UN ANTI-HISTAMINIQUE
DE SYNTHÈSE SUR L'ALLERGIE TUBERCULEUSE
DU COBAYE**

par B. KREIS.

Le rôle attribué à l'histamine dans l'hypersensibilité tuberculinaire nous a conduit, parallèlement à d'autres auteurs, à rechercher l'action possible d'un anti-histaminique de synthèse, le 2339 R.P. ou *antergan*, sur les diverses manifestations de l'allergie chez le cobaye. Nous avons étudié, sur une cinquantaine de cobayes, les modifications apportées par ce produit à l'intradermoréaction, au phénomène de Koch, à la réaction thermique, au choc tuberculinaire mortel, aux lésions histologiques ; nous avons longuement suivi l'évolution de la sensibilité tuberculinaire, chez l'animal, tuberculeux ou sensibilisé par des bacilles morts, et soumis de façon continue à l'anti-histaminique. Nos résultats s'étant montrés dans l'ensemble négatifs, nous aurions hésité à les rapporter après la publication du travail de M. Boquet (1) si les conclusions différentes d'autres auteurs et les interprétations théoriques qu'elles comportent ne nous y avaient engagé.

1^o ACTION SUR L'INTRADERMORÉACTION TUBERCULINIQUE. — Dans aucun cas nous n'avons pu, chez l'animal tuberculeux, modifier l'aspect de l'intradermoréaction provoquée par 0,01 g. de tuberculine, ni retarder son apparition. Il en a été de même en général pour l'intradermoréaction à 0,001 g., même quand cette dose constitue le seuil de réaction tuberculinaire.

Cependant, on observe parfois la négativation des réactions provoquées par 1/10 de mg. de tuberculine ou exceptionnellement par 1 mg. Nous croyons qu'il ne s'agit pas là d'une atténuation de l'allergie par action de l'anti-histaminique, mais d'une simple modification de la réactivité cutanée due à l'action irritante locale du produit ou de son solvant. Les injections répétées d'*antergan* soluble, même dilué, produisent en effet une induration notable de la peau qui n'est plus apte à réagir aux faibles sollicitations. Il suffit pour en avoir la preuve de pratiquer deux intradermoréactions, de même concentration tuberculinaire, l'une à l'endroit des injections d'*antergan*, l'autre en un point différent des téguments. Quant aux réactions plus fortes, elles ne sont pas en général inhibées par les modifications cutanées.

Pour réaliser une concentration locale plus élevée du produit, au moins momentanément, nous avons aussi étudié l'effet des injections intradermiques de *tuberculine* diluée dans la solution d'*antergan* à 2,5 p. 100 (dilution préparée douze heures avant l'emploi). Nous avons ainsi pu obtenir, dans certains cas, des modifications des réponses

(1) Ces *Annales*, 1943, 69, 55.

cutanées, la réaction inflammatoire étant plus faible et l'étendue de la nécrose moindre ; mais là encore intervient l'action irritante du produit qui, administré seul en injection intradermique, détermine une petite zone purulente, puis nécrotique, de 6 à 8 mm. de diamètre, avec induration sous-jacente. Cette action irritante disparaît si l'on utilise pour diluer la tuberculine une solution d'antergan 10 fois moins concentrée. Mais alors les réactions tuberculiniques ne sont pas modifiées, même si l'on adjoint un traitement général par l'antergan à cette injection locale.

En somme, malgré quelques apparents succès, nous n'avons pu apporter avec l'antergan aucune modification appréciable aux phéno-mènes allergiques cutanés des cobayes tuberculeux. Nous dirons tout à l'heure que, chez des animaux traités par l'antergan depuis le jour de l'inoculation, les intradermoréactions n'ont guère différé de celles des témoins.

2^o ACTION SUR LE PHÉNOMÈNE DE KOCH. — Nous nous sommes borné à comparer l'effet de l'injection intradermique de 0,0001 g. de bacilles tuberculeux sur des cobayes inoculés cinquante-huit jours auparavant, par voie sous-cutanée avec 0,001 g. de bacilles, et présentant des réactions identiques aux différentes concentrations de tuberculine. Nous avons obtenu une réaction hémorragique, puis nécrotique précoce, aboutissant à une escarre sèche qui a mis seize jours à s'éliminer sans laisser d'ulcération sous-jacente. L'administration de 0,01 g. d'antergan en 2 injections quotidiennes depuis le jour de l'inoculation n'a modifié en rien les dimensions, ni l'évolution des escarres.

3^o ACTION SUR L'ÉPREUVE THERMIQUE. — Neuf cobayes tuberculeux, fortement allergiques, reçoivent sous la peau 0,04 g. de tuberculine brute. Deux d'entre eux sont soumis en outre à une injection de 0,01 g. d'antergan, une demi-heure avant celle de tuberculine, et de 0,02 g. d'antergan immédiatement après ; 3 autres n'ont eu que 0,02 g. d'antergan immédiatement après la tuberculine ; 4 servent de témoins. Trois cobayes non tuberculeux, non allergiques, sont traités l'un par la tuberculine et l'antergan, l'autre par la tuberculine seule, le dernier par l'antergan seul.

Tous les cobayes tuberculeux traités ont réagi ; l'injection de fortes doses d'antergan semble avoir déprimé initialement la température (comme on le constate aussi chez les témoins normaux) et la réaction a été ainsi plus tardive et, dans l'ensemble, un peu moins forte que celle des témoins tuberculeux non traités.

Nous avons alors cherché à étaler la dose d'antergan et à diminuer celle de tuberculine. En injectant le produit toutes les heures, nous n'avons pas empêché la réaction thermique de se produire, mais avec cette technique, elle survient avant qu'une très forte quantité d'antergan ait pu être administrée. En abaissant encore la dose de tuberculine (0,01 g.), l'épreuve thermique devient irrégulière chez les témoins. Dans l'ensemble, les réactions des animaux traités se sont cependant montrées légèrement atténuées.

Il paraissait donc intéressant d'étudier la réaction thermique chez des animaux moins fortement allergiques. Nous montrerons que chez

les animaux sensibilisés par ces quantités plus ou moins fortes de bacilles tués, émulsionnés en huile de paraffine, elle reste semblable à celle des témoins.

4^e ACTION SUR LE CHOC TUBERCULINIQUE MORTEL. — Une façon particulièrement démonstrative de mettre en évidence une action de l'antergan sur l'allergie tuberculinique était de rechercher s'il pouvait s'opposer au choc mortel déclenché par l'injection sous-cutanée de tuberculine.

Nous nous sommes ingénier à varier les modes d'administration du produit. Dans tous les cas une injection de 0,005 g. a été pratiquée une demi-heure à une heure avant l'épreuve tuberculinique qui s'est toujours accompagnée d'une deuxième injection de 0,005 g. ou plus. Le reste de la dose (de 0,0125 g. à 0,055 g.) a été donné toutes les deux-trois heures ou toutes les demi-heures, jour et nuit, par fractions égales ou variables suivant l'état de l'animal. Certains de nos cobayes avaient été préparés pendant quatre ou cinq jours avant l'épreuve par des injections triquotidiennes du produit.

Nous avons utilisé des animaux de même poids, réagissant fortement aux intradermoréactions tuberculiniques. La dose de 0,40 g. de tuberculine brute sous-cutanée que nous avons employée se situait probablement au voisinage de la quantité minima nécessaire, puisqu'un de nos témoins sur 4 survécut à l'épreuve ; les 3 autres sont morts de cinq à vingt-cinq heures après l'injection. Sur les 7 animaux traités un seul a survécu, les 6 autres sont morts en six à vingt-deux heures. Tous les animaux ayant succombé présentaient les mêmes lésions congestives et périnodulaires de la rate, du foie, des poumons.

Pour réaliser des conditions expérimentales entièrement rigoureuses

TABLEAU I. — Action sur le choc tuberculinique mortel.

NUMÉRO des cobayes	POIDS de l'animal en grammes	DOSES D'ANTERGAN EN GRAMME			DOSE de tuberculine brute	DURÉE de survie
		Avant l'épreuve	Pendant la durée de l'épreuve	Mode d'administration		
1675	495	0,125	0,040	Toutes les 2 à 3 h. pendant 30 h.	0,4	Survit.
1682	475	0,095	0,0325			19 h.
1684	510	0,060	0,0225			7 h.
		(Intervalle libre de 4 jours).				
1680	545	0	0,030	Toutes les heures.		22 h.
1701	500	0	0,0425			8 h.
1696	450	0	0,025	Toutes les 1/2 h.		8 h.
1692	545	0	0,065	Toutes les 1/2 h.		6 h. 30
1666	610	0	0			Survit.
1676	575	0	0			25 h.
1678	490	0	0			5 h.
1695	555	0	0			7 h.

TABLEAU II. — Action sur le choc tuberculinique mortel.

NUMÉRO des cobayes	POIDS de l'animal en grammes	DOSES D'ANTERGAN EN GRAMME			DOSE de tuberculine brute sous- cutanée	DURÉE de survie
		Avant l'épreuve	Pendant l'épreuve	Mode d'administration		
1713	480	0,045 en 3 j.	0,030	Toutes les 2 à 3 h.	0,4	16 h. 30
1714	560 (3 fœtus)	0	0		0,4	7 h.
1757	295	0,20 en 40 j.	0,0275 en 8 h.	Toutes les heures.	0,4	Survit.
1755	260	0	0		0,4	30 h.
1758	285	0,20 en 40 j.	0,015	Toutes les heures.	0,2	3 h. 15
1756	250	0	0		0,2	4 h. 15

nous avons voulu nous adresser à des couples d'animaux inoculés en même temps avec un même poids des mêmes bacilles, l'un deux étant traité par l'antergan depuis le jour de l'inoculation. Nous avons ainsi éprouvé des cobayes inoculés, quarante jours auparavant, par voie sous-cutanée, avec 0,001 g. de bacilles virulents et des cobayes bien moins fortement allergiques ayant reçu sous la peau ou dans le péritoine des bacilles morts enrobés en huile de paraffine. Après injection sous-cutanée de 0,02 g. à 0,04 g. de tuberculine les trois témoins meurent de la quatrième à la trentième heure ; un des cobayes traités par l'antergan survit, les deux autres meurent de la troisième à la seizième heure. Nous ne tirons aucune conclusion de cette survie isolée.

5° ACTION SUR L'ÉTABLISSEMENT DE L'ALLERGIE. — L'agent antihistaminique injecté de façon continue à des cobayes inoculés de bacilles tuberculeux pourrait-il retarder l'apparition de leur allergie ou la diminuer ? En résulterait-il une modification de la dispersion bacillaire ou une transformation des lésions anatomiques ? Ces questions nous ont paru mériter d'être posées.

Nous avons étudié le comportement de 16 cobayes inoculés par voie sous-cutanée, avec des doses fortes (0,001 g.) ou plus faibles (0,000,001 g.) de bacilles humains virulents (pesés humides) ; d'autres animaux ont reçu, par voie sous-cutanée, intra-péritonéale ou intra-testiculaire des doses variables de bacilles tués, émulsionnés en huile de paraffine. Nous avons ainsi réalisé des sensibilisations plus ou moins fortes. L'antergan a été administré à la dose quotidienne de 0,005 g. ou de 0,010 g. répartie en 2 injections sous-cutanées à dix heures d'intervalle depuis le jour de l'inoculation jusqu'à la mort de l'animal. Ces doses ne nous ont pas paru pouvoir être dépassées pour des expériences de longue durée. Les animaux ont été sacrifiés entre le dix-septième et le cent dix-huitième jour.

Le traitement a été parfaitement supporté et les courbes de poids

hebdomadaires des groupes d'animaux traités ou non traités sont restées semblables.

Nous avons suivi l'apparition de la sensibilité dermique, étudié le seuil de réaction à la tuberculine, pratiqué les épreuves thermiques, recherché la date d'apparition des ganglions, évalué quantitativement l'importance des lésions, mesuré la dispersion bacillaire par la culture des organes.

La lecture de nos protocoles portant sur près de quatre mois d'expérience comparative ne fait pas ressortir une action nette et constante de l'antergan, aux doses où nous l'avons utilisé, ni sur l'installation ou les modalités de l'allergie cutanée, ni sur l'aspect de l'étendue des désordres anatomiques. Tout au plus une expérience isolée a-t-elle paru témoigner d'un certain retard de l'établissement de la sensibilité dermique chez les animaux traités ; une autre expérience a montré, dans ce même groupe, une moindre extension lésionnelle.

RÉSULTATS D'ENSEMBLE. — Notre étude expérimentale ne permet pas de confirmer l'opinion de différents cliniciens (2) sur l'atténuation ou la disparition des réactions cutanées à la tuberculine sous l'influence de l'antergan.

D'une façon générale, si quelques résultats isolés paraissent témoigner d'un effet inhibiteur du produit sur l'une des diverses manifestations de l'allergie tuberculeuse, le nombre des constatations négatives, malgré la variété des techniques utilisées, rend une telle action extrêmement douteuse.

Bien que notre étude ait été effectuée chez le cobaye, il paraît évident que le mécanisme des réactions tuberculiniques ne peut guère différer chez cet animal et chez l'homme. Par ailleurs, c'est chez le cobaye que l'action antihistaminique de l'antergan a été étudiée, et s'est montrée particulièrement probante ; rappelons que ce composé protège totalement le cobaye à la dose de 5 mg. par kilogramme, contre 40 doses mortelles d'histamine, l'animal ne manifestant aucun trouble respiratoire, aucun signe de choc ; à la dose de 20 à 25 mg. par kilogramme, il présente complètement les manifestations d'anaphylaxie sérique (3). Les quantités que nous avons utilisées sans succès dans l'étude de l'allergie tuberculeuse sont notablement plus élevées.

Nous nous sommes par ailleurs efforcé, et c'est le point particulier de nos recherches, d'étudier des degrés d'allergie différents, d'utiliser les doses les plus faibles possibles de tuberculine, et les quantités les plus élevées d'antergan, de multiplier les injections du produit pour pallier à la rapidité de son élimination.

Faut-il en déduire que l'activité du composé est encore insuffisante, eu égard aux quantités d'histamine mises en jeu dans les réactions tuberculiniques ? Nous croyons que l'absence d'action de l'antergan a une signification d'un autre ordre. Dans une étude présentée à la Société médicale de Passy et portant sur 70 enfants, dont nous avons déterminé parallèlement la sensibilité tuberculinique et histaminique,

(2) P.-H. ANGLADE, *Revue Tuberc.*, 1943, **8**, 169.

(3) B.-N. HALPERN, *Arch. Int. Pharmacodynamie et Thérapie*, 1942, **68**, 339.

nous avons pu montrer l'absence complète de relations entre les deux courbes (4). Des sujets présentant le même aspect lésionnel et la même sensibilité à l'histamine ont des seuils tuberculiniques différents. L'activité des antihistaminiques nous paraît une raison de plus pour refuser d'assimiler la réaction tuberculinique à une réponse histaminique.

Il ne s'ensuit pas que la recherche d'un composé chimique doué d'une action efficace sur l'allergie tuberculeuse soit une entreprise chimérique. Elle nous paraît au contraire mériter d'être délibérément tentée. Pouvoir modifier durablement l'allergie, être maître d'en régler l'intensité rapidement et sans danger pourrait constituer une acquisition dont il est impossible de mesurer les répercussions thérapeutiques.

La communication suivante paraîtra en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

Sur la sérothérapie de l'intoxication botulique expérimentale du cobaye, par R. LEGROUX et JEAN LEVADITI.

Séance du 1^{er} février 1945.

Présidence de M. GASTINEL.

PROCÈS-VERBAL

A la suite du vœu déposé par A.-R. Prévot dans la séance du 4 janvier 1945, une Commission a été nommée, composée par MM. Lemoigne, Prévot et Bretey, qui se sont réunis et accordés pour présenter à la Société le texte suivant :

1^o Toute espèce nouvelle doit être présentée avec une étude taxonomique complète : genre, famille, ordre et classe.

2^o Pour éviter la disparition des souches des espèces nouvellement décrites — ce qui engendre ultérieurement des difficultés insurmontables de comparaison avec les souches voisines ou identiques, — les bactériologues sont instamment priés d'en déposer un exemplaire à la *Collection Nationale de Bactéries* qui va être créée en France ; ces souches seront à la disposition des systématiciens, des bactériologues

(4) B. KREIS, LE BARRE et Mlle RENAULT, *C. R. Soc. Biol.* (sous presse).

et des biochimistes de toutes les nations afin que la description complète des caractères puisse être faite et la place dans la systématique fixée.

3^o La Société Française de Microbiologie se charge de faire respecter ces propositions par les travailleurs qui lui apportent les résultats de leurs recherches.

4^o Elle se charge en outre d'entrer en pourparlers avec les Sociétés de bactériologie étrangères pour leur demander d'entériner ces mêmes propositions et de les faire appliquer par leurs membres.

Ce texte, mis aux voix, est adopté à l'unanimité par la Société Française de Microbiologie.

ÉTUDE DIFFÉRENTIELLE DES CARACTÈRES TOXIQUES ET ANTIGÉNIQUES DES EXTRAITS TRICHLORACÉTIQUES DE SOUCHES MOBILES ET IMMOBILES D'ALCALIGENES

par R. PIROT, M. BOURGAIN et R. BADRE.

Le groupe *Alcaligenes* comprend actuellement au moins 10 espèces microbienues réputées pathogènes. Leurs actions biologiques sont en général peu marquées ; le caractère le plus saillant étant la non-fermentation des principaux glucides couramment employés pour l'identification microbienne, ce caractère négatif a entraîné beaucoup d'observateurs à confondre sous le nom de *Bacillus Alcaligenes faecalis* Petruschky le groupe et l'espèce. Nous avons constaté, après étude de 36 souches isolées d'excreta ou de produits pathologiques humains, que le diagnostic différentiel d'espèce ne repose pas actuellement sur des caractères culturaux ou biochimiques assez fixes pour assurer un classement définitif. Le pouvoir pathogène expérimental, entre autres pour le lapin et le cobaye, est des plus variables selon les souches d'une même espèce.

Tenant compte du caractère de mobilité ou de non-mobilité, qui nous a paru constant, nous avons pratiqué, selon la méthode de Boivin, l'extraction trichloracétique de l'antigène somatique microbien de trois souches mobiles et de trois souches immobiles. L'étude des pouvoirs toxique et antigénique de ces extraits nous a montré qu'il existe entre eux des différences nettement tranchées.

Les souches ont été classées de la façon suivante (1) :

A) Souches immobiles 1 et 4 : *Alcaligenes metalcaligenes* (ou *ammoniagenes* ; 2 : *A. faecalis*, var. *radicans*).

B) Souches mobiles 7 : *A. faecalis* ; 3 et 9 : *A. recti* (identifié en tenant

(1) En partie, d'après HAUDUROY, *Dictionnaire des bactéries pathogènes*.

compte d'une forte réduction des nitrates en nitrites bien que ne liquéfiant pas la gélatine) (2).

Les conditions d'extraction, dans notre mode opératoire, copié sur celui de Boivin, sont telles que, pour les souches étudiées, 1 c. c. du produit final correspond à 25 mg. de corps bactériens, non desséchés.

Comme dans un travail antérieur (3), nous avons utilisé comme animaux d'expérience des rats blancs adultes d'un poids moyen compris entre 120 et 150 g. et des lapins pesant plus de 2 kg.

RÉSULTATS.

I. Le complexe glucido-lipidique :

a) Présence d'un complexe glucido-lipidique dans les 6 souches, mais avec des variations en poids considérables entre souches mobiles et souches immobiles :

Exemple : souche 3, mobile : 1,60 g. de complexe pour 1.000 g. de corps bacillaires ; souche 1, immobile : 0,175 g. de complexe pour 1.000 g. de corps bacillaires.

b) Pauvreté du complexe en glucide : 4,25 p. 100 exprimé en glucose (au lieu de 40 à 50 p. 100 comme l'indique Boivin), alors que la teneur en lipide et en azote correspond aux chiffres indiqués par différents auteurs.

Lipides : 10 p. 100 ; azote : 6,8 p. 100 ; présence de traces de phosphore.

La structure chimique de ce complexe anormal a retenu notre attention et fait l'objet d'une étude en cours.

II. Pouvoir toxique de l'extrait trichloracétique :

a) Le pouvoir toxique de l'extrait est extrêmement variable d'une souche à l'autre.

b) Seules les souches mobiles présentent un pouvoir toxique nettement accusé : A) *Souches mobiles* (inoculation, par voie cœlomique au rat blanc, de l'extrait neutralisé).

SOUCHES	DOSES minima mortelles de l'extrait comprises entre	DÉLAIS dans lesquels la mort se produit
3	0,25 et 0,50 c.c.	22 heures pour 0,50 c.c.
7	0,50 et 1 c.c.	14 heures pour 1 c.c.
9	1,50 et 2 c.c.	12 heures pour 2 c.c.

La souche 3 à la dose de 1,5 c. c. par voie veineuse tue un lapin de 2,500 kg. en vingt-six heures ; elle ne tue pas à la dose de 0,75 c. c. mais l'animal est très fatigué et accusé une perte de poids de 700 g.

(2) La souche 3 à son isolement fut étiquetée *A. faecalis*, var. *mariense*, en raison de la production abondante d'hydrogène sulfuré. Ce caractère a disparu au cours des repiquages ultérieurs. Nous reviendrons sur ce point.

(3) R. PIROT, M. BOURGAIN et J. DUFAU-CASANABE. *Ces Annales*, 1944, 70, 286.

en quatre jours. Les souches 7 et 9 ne tuent pas aux doses de 1,5 c. c. dans les mêmes conditions.

B) *Souches immobiles* : dans les mêmes conditions expérimentales :

SOUCHES	DOSES minima mortelles de l'extrait comprises entre	DÉLAIS dans lesquels la mort se produit
1	2,5 et 3 c. c.	22 heures pour 3 c. c..
1	3 et 4 c. c.	22 heures pour 4 c. c.
2	3 et 4 c. c.	18 heures pour 4 c. c.

À de telles doses, injectées dans le péritoine du rat, on peut estimer que la toxicité est quasi nulle et ne présente aucun intérêt.

c) *Les délais de mortalité sont proportionnels aux doses injectées :*

SOUCHE	DOSES injectées	DÉLAIS dans lesquels la mort se produit
3	0,25 c. c.	L'animal résiste.
	0,50 c. c.	22 heures.
	1 c. c.	6 heures.

III. Pouvoir protecteur de l'extrait :

a) Seuls les extraits trichloracétiques toxiques des souches mobiles inoculées à doses infra-mortelles protègent l'animal contre des doses mortelles et supra-mortelles.

A) *Souches mobiles* (inoculation par voie cœlomique) :

SOUCHES	DOSES infra-mortelles injectées	DOSES mortelles et supra-mortelles	RÉSULTATS
3	0,25 c. c.	1 c. c. inoculé 46 jours après la dose initiale.	L'animal résiste.
7	0,50 c. c.	1 c. c. inoculé 36 jours après la dose initiale.	L'animal résiste.
9	0,50 c. c.	2 c. c. inoculés 38 jours après la dose initiale.	L'animal résiste.
	1 c. c.	2 c. c. inoculés 38 jours après la dose initiale.	L'animal résiste.

Il y a donc pouvoir protecteur homologue.

B) *Souches immobiles* (mêmes conditions expérimentales) :

SOUCHE	DOSES infra-mortelles injectées	DOSES mortelles et supra-mortelles	RÉSULTATS
4	1 c.c.	3 c.c. 47 jours après la dose initiale.	Animal tué en moins de 24 heures.
1	1 c.c.	4 c.c. 47 jours après la dose initiale	Animal tué en 19 heures.
2	2 c.c.	4 c.c. 47 jours après la dose initiale.	Animal tué en 24 heures.

Pour ces souches, il n'y a donc pas de pouvoir protecteur homologue.

b) Les extraits trichloracétiques des souches mobiles provoquent une protection antitoxique hétérologue. Ce pouvoir n'a évidemment pas été recherché pour les souches immobiles, puisqu'elles ne donnent déjà pas d'immunité homologue.

Exemple :

SOUCHE	DOSE initiale homologue infra mortelle	DOSE hétérologue supra-mortelle	RÉSULTAT
3	0,25 c.c.	1,25 c.c. d'extrait de la souche 7, 27 jours après la dose initiale.	L'animal résiste.

L'extrait 3 protège donc contre l'extrait de la souche 7.

IV. Pouvoir antigénique de l'extrait :

a) Les extraits trichloracétiques très toxiques des souches mobiles possèdent un pouvoir antigénique antimicrobien, ils provoquent la production d'agglutinines chez le lapin.

b) La production d'agglutinines marche de pair avec la toxicité de la souche : en effet, à doses sensiblement égales d'extraits, seules les souches très toxiques sont antigéniques, les souches mobiles toxiques ou peu toxiques se montrent dépourvues de ce caractère :

SOUCHE	DOSES	RÉSULTATS
7 (toxique) . . .	{ 1 ^{re} injection : 1,5 c.c. 2 ^{re} injection : 2 c.c.	{ Ponction cardiaque 30 jours après la 2 ^{re} injection. Agglutinines = 0.
9 (faiblement toxique)	{ 1 ^{re} injection : 1,5 c.c. 2 ^{re} injection : 2 c.c.	{ Ponction cardiaque 30 jours après la 2 ^{re} injection Agglutinines = 0.
3 (très toxique). . .	{ 1 ^{re} injection : 0,75 c.c. 2 ^{re} injection : 1 c.c. 3 ^{re} injection : 2 c.c.	{ Ponction cardiaque 27 jours après la 3 ^{re} injection Agglutinines = +.

Ces trois lapins ont reçu des doses approximativement égales — en volume — d'extrait, et pourtant seule la souche 3 provoque l'apparition d'agglutinines (4).

c) Les agglutinines sont spécifiques de la souche : taux d'agglutination du sérum anti-3 sur la souche 3, = 1/1280.

L'agglutination de groupe ne semble se manifester que pour les souches vraiment toxiques : le sérum agglutinant préparé à partir de la souche 3 agglutine la souche 7 au 1/10, mais non la souche 9, pourtant mobile, mais faiblement toxique. Il ne présente aucun pouvoir agglutinant pour les souches immobiles non toxiques.

V. Absence d'exotoxine :

Les souches mobiles et immobiles ne diffusent pas d'exotoxine. Les filtrats sur bougie (cultures en bouillon vieilles de dix jours) inoculés sous la peau des rats à la dose de 2 c. c. ne provoquent aucune réaction.

CONCLUSIONS.

Si les caractères culturaux et biochimiques, ainsi que le pouvoir pathogène expérimental sur l'animal des germes du groupe *Alcaligenes* ne permettent pas un diagnostic précis et définitif de l'espèce, l'étude des extraits trichloracétiques de ces germes montre qu'il existe selon les souches des différences notables dans leur teneur en antigène somatique complet, type Boivin, et tout particulièrement entre souches mobiles et souches immobiles. De tels résultats apportent leur appui à la conception qui voit dans les *Alcaligenes* des germes ayant tout saprophytes, et occasionnellement pathogènes. Il est permis de penser que le pouvoir pathogène est lié à une certaine richesse des corps microbiens en complexe toxique et antigénique, ces deux fonctions étant étroitement liées.

En ce qui concerne l'aptitude pathogène proprement dite, il en résulte que les souches mobiles sont plus à retenir que les souches immobiles.

(*Laboratoire de Bactériologie de la Marine à Toulon.*)

LE DEUXIÈME PRINCIPE DE LA THERMODYNAMIQUE ET LA VIE

par G. SANDOR.

Nous avons montré ici même (1) que le principe des fluctuations thermodynamiques ne peut pas s'appliquer à la matière vivante et

(4) Il peut s'agir simplement d'une question de poids d'antigène, nous avons vu plus haut les teneurs très variables d'une souche à l'autre en glucido-lipide. Il est probable qu'en injectant des volumes plus considérables nous aurions obtenu l'apparition des agglutinines pour les souches 7 et 9.

(1) G. SANDOR, ces *Annales*, 1946, 72, 275 et *Bulletin de la Société de Chimie biologique* (sous presse).

nous allons examiner présentement les conséquences de cette conclusion.

Les fluctuations des grandeurs thermodynamiques sont des expressions de la distribution des vitesses de Maxwell, dont Boltzmann (2) a donné une démonstration en se basant sur la mécanique statistique. L'auteur montre, en particulier, que pour les gaz parfaits et dans l'approximation de Van der Waals le principe de la distribution des vitesses de Maxwell n'est que l'expression mécanique de celui de l'augmentation de l'entropie ; et dans ce cas nous pouvons ainsi faire correspondre à ce dernier principe une proposition de probabilité que voici : « Spontanément un gaz parfait tend vers l'état pour lequel les distributions des molécules et de leurs vitesses sont plus irrégulières que pour l'état du départ. »

Mais nous voyons que tout ceci n'est vrai que pour un gaz parfait et au maximum dans l'approximation de Van der Waals. Qu'advient-il, par contre, pour les états condensés de la matière ? Cette question capitale, puisque la matière vivante est en phase condensée précisément, n'admet pas une réponse facile. Pour apporter la démonstration directe, il faudrait connaître les équations d'état en phases condensées, or ces équations sont foncièrement ignorées. Cherchons donc la solution du problème d'une façon indirecte.

Nous avons vu que le principe des fluctuations thermodynamiques ne s'applique pas à la matière vivante. Demandons-nous maintenant si celle-ci fait exception au deuxième principe aussi. Clausius, Thomson et Maxwell ont montré que l'expression physique la plus immédiate du deuxième principe de la thermodynamique était l'impossibilité de réaliser le *perpetuum mobile* de deuxième espèce, en dénommant ainsi la machine théorique qui serait capable de fonctionner aux dépens de la chaleur à température constante seulement. Depuis la découverte par Helmholtz de l'énergie libre, nous devons ajouter l'énergie liée à la chaleur à température constante. Or, la machine vivante fonctionne aux dépens de l'énergie potentielle chimique principalement et tous les faits concourent pour démontrer qu'elle obéit au principe du minimum de l'énergie libre en particulier. Le travail est donc fourni aux dépens de l'énergie libre dans le domaine du monde organisé exactement comme dans le cas de n'importe quelle machine chimique.

Si ainsi le deuxième principe s'applique à la vie, tout au moins sous la forme du principe de diminution de l'énergie libre, la conclusion de Boltzmann doit être en défaut puisque sa conséquence directe, la fluctuation thermodynamique, ne se réalise pas au sein de la cellule vivante. Ce fait ne nous étonnera pas outre mesure. En effet, nous avons vu que la conclusion de Boltzmann ne fut tirée que de l'étude de l'équation d'état des gaz et n'admettait pas ainsi une généralisation aux autres états de la matière. Le problème, toutefois, doit être plus approfondi.

Manifestement, le principe de l'augmentation de l'entropie comme celui de la diminution de l'énergie libre excluent tous les deux la naissance spontanée de polarisations des mouvements moléculaires et

(2) BOLTZMANN, *Leçons sur la théorie des gaz*. Gauthier-Villars, Paris, 1905.

nous exposerons ailleurs ce problème du point de vue mathématique. Toujours, en effet, lorsque de l'énergie interne se transforme en travail le mouvement désordonné des molécules, dont l'effet se dissipe pour des étendues microscopiques de la matière, doit étendre son effet à des masses visibles de celle-ci. Or à ceci correspond nécessairement une polarisation des mouvements moléculaires. A l'impossibilité de réaliser le *perpetuum mobile* de deuxième espèce correspond donc l'énoncé que spontanément les mouvements moléculaires ne peuvent que se dépolariser.

Il y a ainsi une ressemblance frappante entre le principe de Boltzmann et le support mécanique direct du deuxième principe puisque nous retrouvons pour celui-ci encore une tendance spontanée vers l'irrégularité. Il y a, toutefois, une différence fondamentale entre les deux. C'est que le deuxième principe dans sa généralité ne peut admettre qu'une application à l'échelle macroscopique. Il règle, en effet, essentiellement la répartition entre le travail et les autres formes de l'énergie et l'on conçoit à la base que toutes les formes de l'énergie dont les paramètres sont mécaniques à l'échelle visible, sont équivalentes avec du travail. Mais le deuxième principe ne peut rien prédire quant à l'échelle microscopique ou moléculaire. En effet, une organisation à cette échelle ne permettrait nullement de réaliser le *perpetuum mobile* de deuxième espèce, même si elle se faisait spontanément. Or, précisément, la cellule admet presque certainement une organisation à l'échelle moléculaire. Ce fait explique que le principe des fluctuations thermodynamiques ne puisse lui être appliqué. Mais comme la cellule elle-même reste à l'échelle microscopique son fonctionnement organisé peut ne pas être en contradiction avec le deuxième principe à proprement parler.

(Institut Pasteur.)

Le Gérant : G. MASSON.